

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Fisiología



TESIS DOCTORAL

Excitabilidad intrínseca y su plasticidad en el hipocampo de rata

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alberto Sánchez-Aguilera López

Directores

**Asunción Colino Matilla
María Ángeles Vicente Torres**

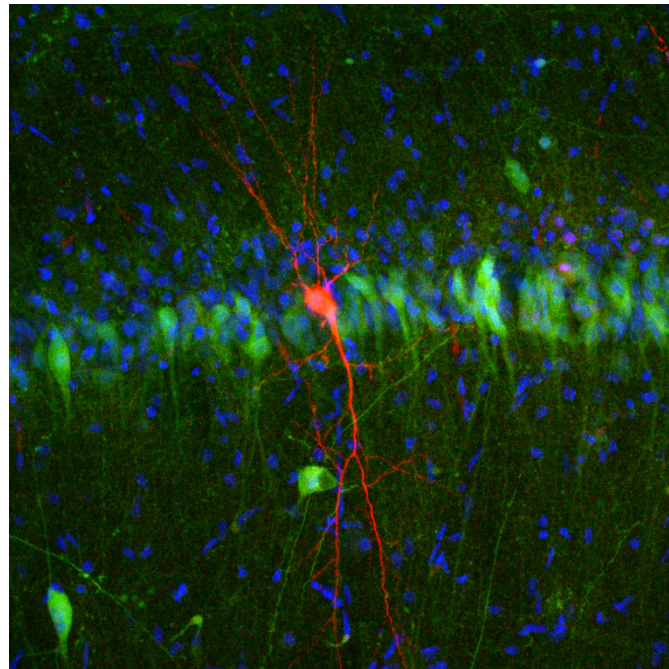
Madrid, 2017



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS



EXCITABILIDAD INTRÍNSECA Y SU PLASTICIDAD EN EL HIPOCAMPO DE RATA

TESIS DOCTORAL
ALBERTO SÁNCHEZ-AGUILERA LÓPEZ

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA



EXCITABILIDAD INTRÍNSECA Y SU PLASTICIDAD EN EL HIPOCAMPO DE RATA

Memoria de investigación presentada por ALBERTO SÁNCHEZ-
AGUILERA LÓPEZ para optar al grado de Doctor

Directores de la Tesis Doctoral:
Dra. ASUNCIÓN COLINO MATILLA
Dra. M^a ÁNGELES VICENTE TORRES

Madrid, 2015

D^a. Asunción Colino Matilla y D^a. M^a Ángeles Vicente Torres del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

HACEN CONSTAR: Que Alberto Sánchez-Aguilera López ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de su Tesis Doctoral “Excitabilidad intrínseca y su plasticidad en el hipocampo de rata”, que ha terminado con el mayor aprovechamiento.

Revisado el presente trabajo, en nuestra opinión reúne los requisitos científicos de originalidad y rigor metodológico suficientes para ser juzgado como Tesis Doctoral.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmamos la presente en Madrid a 15 de octubre de 2015.

Fdo: Asunción Colino Matilla.

Fdo: M^a Ángeles Vicente Torres

Este trabajo se realizó con la ayuda económica del Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2010-20073 y BFU2012-37156-C03-01). Alberto Sánchez-Aguilera López también fue dotado con una Beca predoctoral para formación de investigadores UCM (convocatoria 2010/2011).

En la portada se muestra una neurona piramidal del área CA1 del hipocampo (rojo) registrada por Alberto Sánchez-Aguilera López y procesada histológicamente por la Dra. Elena Cid, investigadora del Instituto Cajal.

«El verdadero trabajo se hace desde
dentro. Las pequeñas células grises...,
recuerde siempre las pequeñas células
grises, *mon ami*»

Asesinato en el campo de golf. Agatha Christie

AGRADECIMIENTOS

Con la escritura de esta tesis pongo fin a un camino que comencé a finales de 2009. Seis intensos años de continuo aprendizaje cuyo balance final es muy positivo, más allá de la futura obtención de un título. He adquirido nuevos conocimientos, sobre todo relativos al campo de la electrofisiología, el cual reconozco que era (y continúa siendo, aunque un poquito menos) desconocido para mí. Además, he tenido la oportunidad de ver el funcionamiento de una clase desde el otro lado de la barrera. Por último, y más importante, he conocido a una serie de personas maravillosas, que junto a las que ya se encontraban en mi entorno, han sido una parte fundamental de esta etapa y sin las cuales yo no podría haber realizado este trabajo. Por ello, los primeros párrafos de la tesis están dedicados a vosotros.

En primer lugar tengo mucho que agradecer a la Dra. Asunción Colino. Me abrió las puertas de su laboratorio, y a lo largo de este periodo ha hecho de él un hogar para mí, me ha transmitido su pasión por la ciencia, me ha enseñado (y me continúa enseñando) multitud de cosas y me ha guiado excelentemente en todos los pasos realizados. Similares palabras son extrapolables a la Dra. M^a Ángeles Vicente, pues me ha transmitido numerosos conocimientos y siempre me ha ayudado en todo lo que he necesitado. Sin duda he tenido la gran suerte de tener a dos directoras con un currículum investigador y académico extraordinario, de las que he aprendido mucho, y de las que sobre todo destaco su componente humano y el buen trato que me han dado, algo que para mí ha sido fundamental.

El siguiente en la lista es el Dr. José Luis Sánchez. Ha sido una suerte y un placer tener un compañero y amigo como él, con un carácter tan agradable. Muchas gracias por todo lo que me has enseñado y ayudado durante los años que hemos compartido en el laboratorio de Asun, y por todas las conversaciones científicas o frikis que sirvieron para amenizar cada día. Tampoco me puedo olvidar de Nuria y de Gonzalo, quienes hicieron que la marcha de José Luis fuera más llevadera con su simpatía.

También tengo que agradecer a todo el personal del Departamento de Fisiología el haberme acogido entre ellos. En especial a los miembros del laboratorio del Dr. Francisco Mora y a la Dra. Carmen Fernández por recibirme con agrado cada vez que he tenido que parasitar sus laboratorios para guardar o procesar muestras. A Giaco tengo que agradecerle toda la ayuda proporcionada y todos los cafés/coca colas, las comidas y el resto de ratos que sirvieron para desconectar del día a día.

Al Dr. Gregorio Segovia y al Dr. José Antonio García-Baró por revisar la tesis, y a este último quiero agradecer su ayuda para hacer más sencillo y agradable un texto que ya de por sí es bastante duro. En este bloque de correcciones también quiero meter a mis directoras, que me han ayudado mucho para que la tesis esté bien escrita y sea lo más legible posible.

Entro en el apartado Cajal, y de nuevo tengo que dar las gracias a Asun y a M^a Ángeles por darme la oportunidad de vivir esa experiencia. Continúo con la Dra. Liset Menéndez de la Prida por acogerme en su laboratorio como a uno más desde el primer día, por enseñarme tantas cosas y por su paciencia y sus consejos. A su grupo de trabajo (los doctores/as Beatriz, Diego, Elena y François, los predoctorales Dani y Manu, y los estudiantes Luis, Jorge, Miriam, Óscar y Pedro), todos ellos gente brillante pero que por encima de todo destacan por su simpatía y su buen trato. Me llevo buenísimos recuerdos a su lado, pero tengo que resaltar cada vez que nos quedábamos hipnotizados con el vídeo-demostración del estudio realizado por Grossi y colaboradores (2014), al cual han otorgado recientemente el premio Ig Nobel 2015 en el apartado de Biología (¡Sí, el dino-chicken! Os dije que lo citaría en mi tesis). Y no me puedo olvidar de las forasteras Edina y Marie, cuya estancia dio aún más vida al laboratorio. Termino este apartado con el resto de jóvenes talentos con quienes he tenido el privilegio de compartir muchas tardes en el Tux o similares (en especial Anna, Clara y Sonia, a quienes he visto con más frecuencia y quienes se han interesado continuamente por la progresión en la escritura de la tesis).

De los párrafos anteriores se deduce que no he podido caer en mejores manos porque lo más importante para mí, más allá de los resultados, es tener un buen ambiente y tratar de hacer bien las cosas, y en ambos aspectos no creo que haya mejores laboratorios que los de Asun y Liset.

También quiero agradecer al personal de los animalarios de la Facultad de Biología y del Instituto Cajal por el buen cuidado y el interés depositado en mis ratas. Sin esa labor no podría confiar tanto en mis resultados.

No me quiero olvidar de la Dra. Carmen Rúa, con quien di mis primeros pasos en el campo de la neurociencia y quien siempre ha estado interesada en mi evolución durante mi fase predoctoral. Tampoco puedo olvidar al Dr. Íñigo Azcoitia, pues sin aquel encontronazo en el pasillo de su departamento no hubiera terminado en el laboratorio de Asun.

Fuera del ámbito académico/investigador, toca agradecer a la familia. En primer lugar quiero dar las gracias mis padres, Pedro Luis y Rosa M^a. Gracias por ser el mejor ejemplo a seguir que he podido tener y por el esfuerzo que habéis hecho para que yo tuviera la mejor

educación posible. Y gracias por todo el apoyo que me habéis dado durante estos años, pues el mundo de la investigación es muy gratificante cuando salen las cosas, pero cuando no salen es muy frustrante, y al final del día siempre estabais vosotros para animarme. A mi hermano Carlos también le tengo que dar las gracias por los mismos motivos, pero además le añado su colaboración desinteresada en varios momentos de esta etapa, destacando su implicación en la corrección de mi tesis. Por último destacar el interés que ha tenido el resto de mi familia en la evolución de mi tesis (con mención especial para mi tía Pili y mi tía Aúrea, para quien según qué día yo era Médico, Doctor, Profesor de universidad, Catedrático... pues bien, dentro de poco tiempo espero que puedas presumir de sobrino Doctor sin equivocarte).

A mis amigos “biólogos”, quienes son una segunda familia para mí. Alberto, Alex, Alfredo, Ana, Cacho, Carlos, Chus, David, Elena, Gema, Isaac, Laura, Miguel... A unos os he visto casi cada semana y a otros con menos frecuencia durante estos últimos años, pero muchas gracias a todos por vuestro interés y apoyo.

A los chicos de mi equipo, quienes me permiten desconectar totalmente del mundo científico, lo cual se agradece muchísimo cuando el resto de tu vida está saturada de ciencia. Muchas gracias, Balonmano Base Villaverde.

Por último, quiero dar las gracias a las auténticas protagonistas de esta historia que voy a contar en las siguientes páginas: mis pequeñas ratitas.

MUCHAS GRACIAS A TODOS.

ABREVIATURAS

4-AP	4-Aminopiridina
ADP	Despolarización post-potencial (<i>after-depolarization potential</i>)
AHP	Hiperpolarización post-potencial (<i>after-hyperpolarization potential</i>)
AP5	D-2-amino-5-fosfonopentanoato
ATP	Trifosfato de adenosina
BAPTA	Ácido 1,2-bis (2-aminofenoxi) etano-N,N,N',N'-tetraacético
CA	Asta de Ammon (<i>cornu Ammonis</i>)
Cm	Capacidad de la membrana
CNQX	6-ciano-7-nitroquinoxalino-2,3-diona
EGTA	Ácido etilen glicol-bis (2-aminoetileter)-N,N,N',N'- tetraacético
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GD	Giro dentado
GTP	Trifosfato de guanosina
HEPES	Ácido 4-(2-Hidroxietil) piperazina-1-etanosulfónico
I_M	Corriente de potasio tipo M
I_{NaP}	Corriente persistente de sodio
I_{NS}	Corriente catiónica no específica
ISI	Intervalo de tiempo entre potenciales de acción (<i>interspike interval</i>)
I_T	Corriente de calcio tipo T
KChIPs	Proteínas de interacción con los canales Kv4 (<i>Kv4 channel-interacting proteins</i>)
KRB	Krebs-Ringer-Bicarbonato
LTP	Potenciación a largo plazo (<i>long-term potentiation</i>)
NMDA	N-metil-D-aspartato
P9-19	Ratas de edad comprendida entre 9 y 19 días postnatales
PA	Potencial de acción
PAGE-SDS	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
PBS	Tampón fosfato salino
PEPS	Potencial excitador post-sináptico
PIPS	Potencial inhibidor post-sináptico

Rm	Resistencia de la membrana
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
TTX	Tetrodotoxina
Vel. Despolarización	Velocidad de despolarización
Vel. Repolarización	Velocidad de repolarización
Vm reposo	Potencial de la membrana en reposo
T	Constante de tiempo

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
SUMMARY	7
INTRODUCCIÓN	13
1. Hipocampo. Estructura y función.....	15
2. El potencial de acción.....	17
2.1. Bases del estudio del potencial de acción.....	17
2.2. Corrientes que intervienen en el potencial de acción.	19
3. Excitabilidad intrínseca.	23
3.1. Generalidades.	23
3.2. Relaciones entre el potencial de reposo y el umbral de disparo.	24
3.3. Importancia de los iones divalentes para la excitabilidad neuronal.	26
3.4. Evolución de la excitabilidad neuronal durante el desarrollo.....	28
4. Patrón de disparo de las neuronas piramidales de CA1.	30
4.1. Tipos de patrón de disparo.	30
4.2. Despolarización post-potencial y patrón de disparo en las neuronas piramidales de CA1.	31
4.3. Evolución del patrón de disparo durante el desarrollo.....	33
5. Plasticidad de la excitabilidad intrínseca.	34
5.1. Consideraciones generales.....	34
5.2. Modificaciones producidas en la relación entrada-salida.....	36
5.3. Plasticidad intrínseca en función de su localización.	39
5.3.1. Plasticidad intrínseca en las dendritas.	39
5.3.2. Plasticidad intrínseca en el soma y el axón.	41
5.4. Plasticidad homeostática.	44
5.5. Cambios dependientes de actividad en la morfología del potencial de acción.....	45
OBJETIVOS	49
MATERIAL Y MÉTODOS.....	53
1. Animales de experimentación.	55
2. Obtención de las rodajas y células disociadas de hipocampo.	55
3. Cámara de mantenimiento.	56
4. Unidad de registro.....	57
5. Soluciones empleadas.....	60

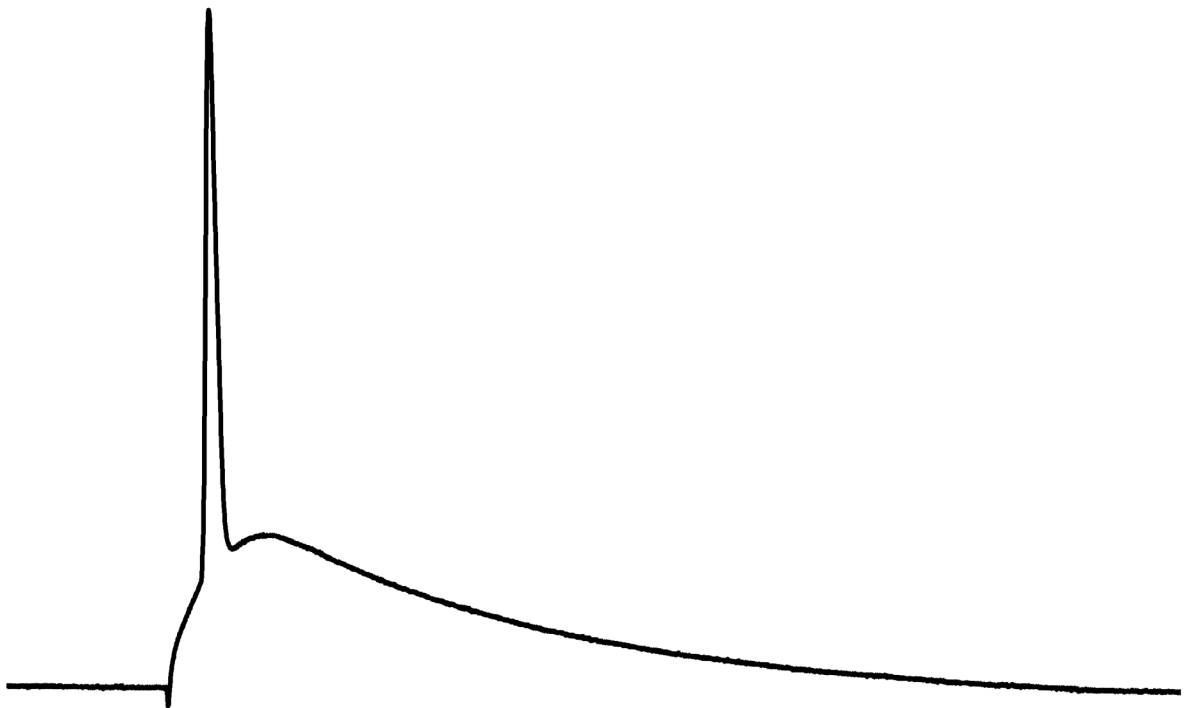
6. Reactivos y drogas.....	62
7. Técnicas electrofisiológicas.....	63
7.1. Registro en rodaja.....	63
7.2. Registro de células disociadas.....	65
8. Análisis de los registros electrofisiológicos.....	67
8.1. Medición de las propiedades básicas de la membrana.....	67
8.2. Medición de los parámetros del potencial de acción.....	68
8.3. Interpretación de los diagramas de fase.....	70
8.4. Cálculo de los porcentajes de plasticidad.....	72
8.5. Medición de los parámetros de la despolarización post-potencial.....	73
8.6. Clasificación del patrón de disparo.....	74
8.7. Medición de la intensidad de corriente tipo A en los experimentos de fijación de voltaje.....	75
8.8. Obtención de la constante de tiempo de caída de las corrientes en los experimentos en fijación de voltaje.....	76
9. <i>Western blot</i>	77
9.1. Extracción de proteínas de la membrana.....	77
9.2. Preparación de las muestras para <i>Western blot</i> en condiciones desnaturalizantes.....	77
9.3. Análisis del <i>Western blot</i>	78
10. Análisis estadístico.....	80
RESULTADOS.....	81
1. Evolución de la excitabilidad intrínseca de las neuronas piramidales de CA1 durante las primeras etapas del desarrollo postnatal.....	83
1.1. Estudio de las propiedades pasivas de la membrana en el desarrollo postnatal.....	83
1.2. Estudio de la morfología del potencial de acción en el desarrollo postnatal.....	85
1.3. Estudio de la morfología del potencial de acción durante un tétanos en desarrollo postnatal.....	88
1.4. Evolución de la excitabilidad en el desarrollo postnatal.....	98
2. Una nueva plasticidad de la excitabilidad intrínseca a corto plazo en las neuronas piramidales de CA1 del hipocampo.....	103
2.1. El potencial de la membrana afecta a las propiedades pasivas de la membrana neuronal.....	103
2.2. El potencial de la membrana afecta a la morfología de los potenciales de acción.....	105
2.2.1. Efecto de la duración del pulso o rampa despolarizante previa a la inducción del potencial de acción sobre su morfología.....	105
2.2.2. La despolarización sostenida genera una plasticidad a corto plazo en el potencial de acción.....	110

2.2.3.	La plasticidad a corto plazo inducida por despolarización sostenida es detectada cuando el potencial de acción es generado por potenciales sinápticos excitadores.	118
2.2.4.	La plasticidad a corto plazo inducida por despolarización sostenida es específica de las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo.	121
2.3.	Perfiles temporales para la inducción y extinción de la plasticidad intrínseca a corto plazo inducida por una despolarización sostenida.	124
2.3.1.	Perfil temporal del proceso de inducción de la plasticidad intrínseca a corto plazo.	124
2.3.2.	Perfil temporal del proceso de extinción de la plasticidad intrínseca a corto plazo.	128
2.4.	La plasticidad intrínseca a corto plazo disminuye la excitabilidad neuronal.	132
2.4.1.	En respuesta a pulsos largos.	132
2.4.2.	En respuesta a pulsos cortos.	136
2.5.	La despolarización sostenida incrementa la corriente A de potasio.	139
2.5.1.	El bloqueante 4-aminopiridina (3 mM) bloquea la plasticidad intrínseca.	139
2.5.2.	La plasticidad intrínseca a corto plazo afecta a la corriente tipo A aislada por prepulso de inactivación.	144
2.6.	La inducción de la plasticidad intrínseca requiere el calcio que entra por los canales de calcio tipo T.	147
2.6.1.	La inducción de la plasticidad intrínseca es dependiente de calcio.	147
2.6.2.	La inducción de la plasticidad intrínseca no es dependiente de receptores NMDA.	153
2.6.3.	La inducción de la plasticidad intrínseca se debe al calcio que ingresa por los canales tipo T.	155
2.7.	Mecanismos de expresión de la plasticidad intrínseca a corto plazo.	160
2.7.1.	El calcio procedente de la corriente T modula la corriente de potasio tipo A.	160
2.7.2.	La modulación de la corriente tipo A por la corriente tipo T es más probable que ocurra con el avance del desarrollo.	163
2.7.3.	La proteína de interacción con los canales de potasio 3 (<i>potassium channel-interacting protein 3, KCHIP3</i>) es el sensor de calcio.	165
3.	Efectos del calcio extracelular sobre la excitabilidad intrínseca de las neuronas piramidales de CA1.	169
3.1.	La concentración extracelular de calcio no afecta a las propiedades pasivas de la membrana.	169
3.2.	Efecto de la concentración extracelular de calcio sobre la morfología del potencial de acción.	171
3.3.	Efecto de la concentración extracelular de calcio sobre la despolarización post-potencial.	176
3.4.	Efecto de la concentración extracelular de calcio sobre la excitabilidad neuronal.	182

3.4.1.	La concentración extracelular de calcio afecta al patrón de disparo de potenciales de acción.	182
3.4.2.	La concentración extracelular de calcio afecta a la frecuencia de disparo de potenciales de acción.	186
DISCUSIÓN		193
1.	Evolución de la excitabilidad intrínseca de las neuronas piramidales de CA1 durante las primeras etapas del desarrollo postnatal.....	195
1.1.	Las propiedades pasivas de la membrana cambian durante el desarrollo postnatal.....	195
1.2.	La morfología del potencial de acción cambia durante el desarrollo postnatal.....	196
1.3.	La excitabilidad neuronal cambia durante el desarrollo postnatal.....	204
1.4.	Resumen.....	206
2.	Una nueva plasticidad de la excitabilidad intrínseca a corto plazo en las neuronas piramidales de CA1 del hipocampo.	209
2.1.	El potencial de la membrana afecta a las propiedades pasivas de la membrana neuronal.	209
2.2.	La despolarización sostenida genera una plasticidad a corto plazo en el potencial de acción de las neuronas piramidales de CA1 del grupo P16-19.	211
2.3.	La plasticidad a corto plazo expresada en las neuronas piramidales de CA1 del grupo P16-19 afecta a su excitabilidad intrínseca.	218
2.4.	La corriente de potasio tipo A tiene un papel importante en la expresión de la plasticidad intrínseca a corto plazo.....	221
2.5.	El calcio que ingresa por los canales tipo T induce la plasticidad intrínseca a corto plazo.	223
2.6.	Mecanismo de inducción de la plasticidad intrínseca a corto plazo.....	225
2.7.	Expresión de la plasticidad intrínseca a corto plazo.	228
2.8.	Implicaciones funcionales de la plasticidad intrínseca a corto plazo.....	229
2.9.	Resumen.....	230
3.	Efectos del calcio extracelular sobre la excitabilidad intrínseca de las neuronas piramidales de CA1.	233
3.1.	La concentración extracelular de calcio afecta a la morfología del PA.....	233
3.2.	La concentración extracelular de calcio afecta a la excitabilidad neuronal.....	235
3.2.1.	La concentración extracelular de calcio no afecta a las propiedades electrofisiológicas básicas.	235
3.2.2.	La concentración extracelular de calcio afecta a la frecuencia de disparo.....	236
3.2.3.	La concentración extracelular de calcio afecta a la despolarización postpotencial y al patrón de disparo.	237
3.3.	Resumen.....	240
4.	Discusión general.	243

4.1.	Mecanismos homeostáticos de la excitabilidad neuronal durante el desarrollo.	243
4.2.	Importancia del calcio a nivel de circuitos.	244
4.3.	Alteraciones de la homeostasis. Hiperexcitabilidad.	246
CONCLUSIONES.....		247
BIBLIOGRAFÍA		253
ANEXO: PUBLICACIONES		281

RESUMEN



Excitabilidad intrínseca y su plasticidad en el hipocampo de rata.

INTRODUCCIÓN

Durante las primeras semanas del desarrollo postnatal se producen cambios en las propiedades electrofisiológicas y morfológicas (Pokorny & Yamamoto 1981a; Pokorny & Yamamoto 1981b; Schwartzkroin & Kunkel 1982; Liao et al. 1999), así como en la conectividad sináptica (Hsia et al. 1998; Groc et al. 2003) de las neuronas piramidales de CA1. Además, aumenta el comportamiento exploratorio que depende de la actividad hipocampal en las ratas (Langston et al. 2010).

La propagación de la información dentro de un circuito neuronal como el hipocampal, depende de la conectividad sináptica dentro del circuito y de las propiedades intrínsecas de cada neurona. Cambios en la actividad del circuito pueden provocar plasticidades en: la eficacia sináptica, la integración de la señal de entrada y la generación de una señal de salida (Daoudal & Debanne 2003; Debanne et al. 2003; Remy et al. 2010). Diversos estudios han demostrado la existencia de plasticidades de la excitabilidad intrínseca en respuesta a variaciones de la actividad previa (Fan et al. 2005; O'Leary et al. 2010; Cudmore et al. 2010; Campanac et al. 2013).

El calcio es un ion fundamental en el mantenimiento de la excitabilidad neuronal. La disminución de su concentración extracelular se relaciona con crisis epilépticas (Heinemann et al. 1977) y con un comportamiento epileptiforme en estudios *in vitro* (Bikson et al. 2002; Isaev et al. 2012; Aivar et al. 2014). Además, el calcio está implicado en gran parte de las plasticidades sinápticas e intrínsecas descritas (Katz & Miledi 1968; Lynch et al. 1983; Zucker & Regehr 2002; Fan et al. 2005; Grubb & Burrone 2010).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Pese a la gran diversidad de trabajos que se han realizado sobre la fisiología del hipocampo, todavía no se ha abordado un estudio en profundidad a lo largo del desarrollo sobre la excitabilidad e inducción de posibles plasticidades intrínsecas en neuronas piramidales de CA1. Por ello, en esta tesis se plantearon tres objetivos fundamentales:

- Estudiar la evolución de las características electrofisiológicas durante el período comprendido entre los 9 y los 19 días.
- Estudiar la importancia del potencial de la membrana sobre la excitabilidad neuronal y la plasticidad intrínseca durante el período comprendido entre los 9 y los 19 días.
- Estudiar el papel del calcio extracelular sobre la excitabilidad neuronal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para realizar los experimentos se emplearon ratas de la raza Wistar de dos períodos de edad: entre 9 y 12 días (P9-12) y entre 16 y 19 días (P16-19). Para estudiar la excitabilidad neuronal se realizaron registros electrofisiológicos mediante la técnica de *patch-clamp* en célula entera, tanto en fijación de corriente como en fijación de voltaje. Además, se realizaron experimentos de *Western Blot* para analizar la expresión de los canales Kv4.2 y Cav3.2.

RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

1.-Estudiar la evolución de las características electrofisiológicas durante el período comprendido entre los 9 y los 19 días.

- De las propiedades electrofisiológicas pasivas. Durante este período del desarrollo se hiperpolariza el potencial de reposo, aumenta la capacidad y disminuye la resistencia y la constante de tiempo de la membrana. Estos resultados están relacionados con un crecimiento del árbol dendrítico (Pokorny & Yamamoto 1981a; Pokorny & Yamamoto 1981b; Schwartzkroin & Kunkel 1982) y un incremento de la densidad de canales iónicos que se activan a potenciales de la membrana próximos al de reposo durante el desarrollo (Vasilyev & Barish 2002; Surges et al. 2006; Safiulina et al. 2008). La disminución de la resistencia de la membrana observada durante dicho período del desarrollo provoca una disminución de la excitabilidad neuronal.
- De la morfología del potencial de acción (PA). Durante el desarrollo el umbral de disparo se hiperpolariza, la amplitud y la duración media del PA aumentan debido al incremento de la corriente transitoria de sodio y a la disminución de

la corriente de potasio tipo A (Klee et al. 1995; Costa 1996; Sánchez-Alonso et al. 2012). Además, se demuestra que la corriente tipo A interviene en la fase despolarizante del PA, y su participación disminuye durante el desarrollo. El incremento de la duración media que presentan los PAs durante las descargas tetánicas disminuye durante el desarrollo, debido a que disminuye la contribución de la corriente tipo A y se incrementan otras corrientes de potasio con cinéticas de inactivación más lentas (Costa et al. 1994; Klee et al. 1995; Aoki & Baraban 2000; MacDonald et al. 2006; Guan et al. 2011; Sánchez-Alonso et al. 2012). Asimismo, el aumento en la velocidad de repolarización del PA que se adquiere durante el desarrollo permite incrementar la frecuencia de disparo máxima de la neurona.

2.- Estudiar la importancia del potencial de la membrana sobre la excitabilidad neuronal y la plasticidad intrínseca durante el período comprendido entre los 9 y los 19 días.

Estos estudios demuestran la importancia que tiene la duración de una despolarización subumbral sobre la excitabilidad de las neuronas piramidales de CA1. En ese aspecto, al despolarizar la membrana a -60 mV durante 5 minutos, el PA generado:

- En el grupo P9-12 presenta una duración media del PA mayor que el generado a -80 mV debido a una inactivación de la corriente tipo A (Ma & Koester 1996; Kim et al. 2005; Gu et al. 2007).
- En el grupo P16-19 genera una plasticidad intrínseca a corto plazo que disminuye la excitabilidad y la duración media del PA con respecto al generado a -80 mV. Dicha plasticidad se caracteriza por:
 - A. Inducirse a partir de despolarizaciones que presenten duraciones superiores a 15 segundos, siendo máxima cuando es de 5 minutos.
 - B. Se revierte al hiperpolarizar la membrana a -80 mV.
 - C. La inducción de la plasticidad depende del calcio que entra por los canales Cav3 y provoca un incremento de la corriente de potasio tipo A y aumenta su constante de tiempo de su inactivación.
 - D. El sensor del calcio es la proteína de interacción con los canales Kv4 tipo 3 (KChIP3). Estudios previos ya describieron la formación de complejos Cav3-Kv4 en los que el calcio que entra por los canales

Cav3 modula los canales Kv4 a través de la KChIP3 (Anderson et al. 2010 a; Anderson et al. 2013; Heath et al. 2014).

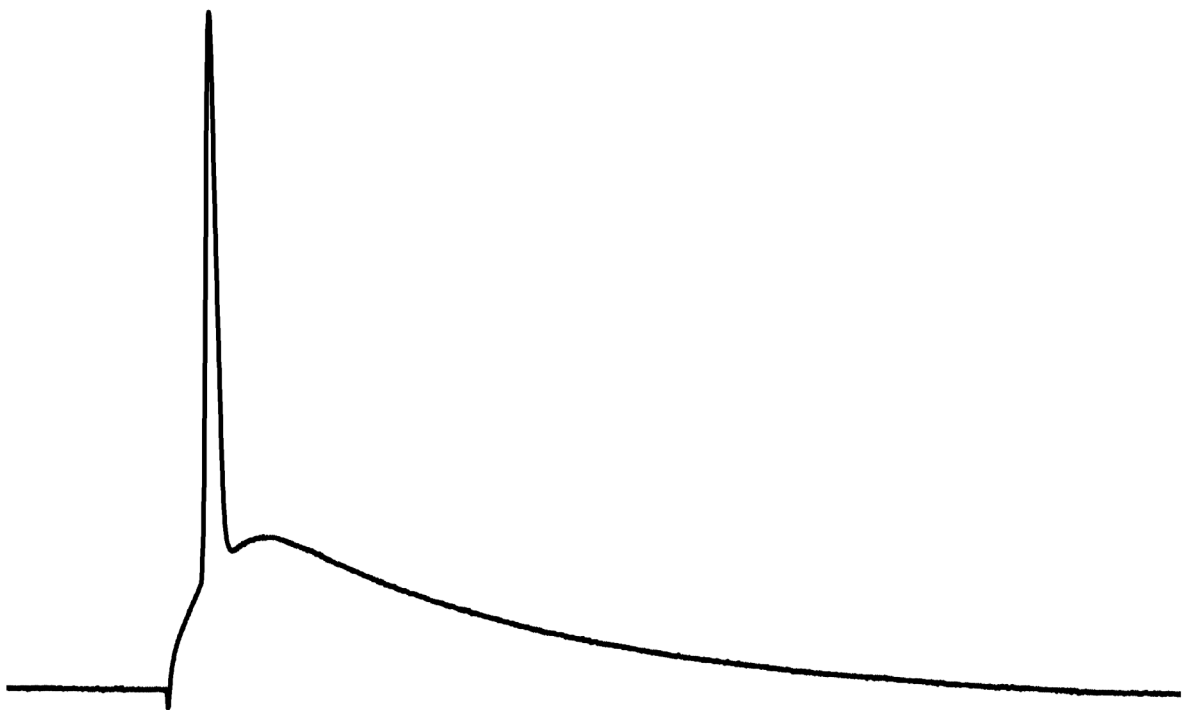
E. Es específica de las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo.

3.- Estudiar el papel del calcio extracelular sobre la excitabilidad neuronal.

Estos estudios ponen de manifiesto que la disminución en la concentración extracelular de calcio produce cambios:

- En la morfología del PA. Hiperpolariza el umbral de disparo debido al desplazamiento hacia la izquierda de la curva de activación del sodio (Hille 1968; Hahn & Campbell 1983; Hille 2001). Disminuye la velocidad de la segunda mitad de la fase repolarizante debido a una activación ineficaz de corrientes de potasio dependientes de calcio, como la tipo BK (Lancaster & Nicoll 1987; Storm 1987; Shao et al. 1999; Gu et al. 2007; Sun et al. 2009).
- En la excitabilidad neuronal. La aumenta y bloquea la generación de los PAs ante estímulos de alta intensidad
- En la despolarización post-potencial. Disminuye la amplitud y la duración media, lo que promueve un patrón de disparo regular debido a la reducción de la corriente de calcio tipo T (Magee & Carruth 1999; Jung et al. 2001; Metz et al. 2005; Sánchez-Alonso et al. 2010).

SUMMARY



Intrinsic excitability and its plasticity in the rat hippocampus.

INTRODUCTION

Rat hippocampus extends its maturation to postnatal periods. Morphological and electrophysiological characteristics (Pokorny & Yamamoto 1981a; Pokorny & Yamamoto 1981b; Schwartzkroin & Kunkel 1982; Liao et al. 1999) and the synaptic connectivity (Hsia et al. 1998; Groc et al. 2003) of the CA1 pyramidal neurons acquire mature features during the first month of age. Around this developmental stage, the animal engages in exploratory behaviours that are dependent on hippocampus activity (Langston et al. 2010).

Propagation of information in a neural circuit such as the hippocampus depends on the synaptic connectivity within the circuit as well as on the intrinsic properties of neurons. Activity-dependent changes in the circuit may evoke plasticities on: synaptic efficacy, integration of the synaptic inputs and induction of the output signal (Daoudal & Debanne 2003; Debanne et al. 2003; Remy et al. 2010). During the last decade, several studies have shown the existence of plastic activity-dependent changes in the intrinsic excitability (Fan et al. 2005; O'Leary et al. 2010; Cudmore et al. 2010; Campanac et al. 2013).

Calcium is a basic ion for the neuronal excitability. Decreases in extracellular calcium levels were related to seizure activity (Heinemann et al. 1977), and epileptic-like behaviour during *in vitro* experiments (Bikson et al. 2002; Isaev et al. 2012; Aivar et al. 2014). Furthermore, calcium is involved in almost all forms of synaptic and intrinsic plasticities (Katz & Miledi 1968; Lynch et al. 1983; Zucker & Regehr 2002; Fan et al. 2005; Grubb & Burrone 2010).

OBJECTIVES

The hippocampal physiology has been extensively studied. However, the evolution of the CA1 pyramidal neurons excitability along the development and its potential intrinsic plasticities have not been studied in detail. For that reason, the present thesis has been focused on three main goals:

- To study the development of the basic electrophysiological features of the CA1 pyramidal neurons between 9 and 19 postnatal days.

- To study the involvement of the membrane potential in the neuronal excitability and its plasticity between 9 and 19 postnatal days.
- To study the role of the extracellular calcium in the neuronal excitability.

MATERIAL AND METHODS

Experiments were performed with Wistar rats of two different postnatal periods: between 9 and 12 days (P9-12) and between 16 and 19 days (P16-19). *Patch-clamp* recordings were performed in current-clamp and voltage-clamp configuration to study the neuronal excitability. Moreover, *Western blot* experiments were made to analyse the expression of the Kv4.2 and Cav3.2 channels.

RESULTS, DISCUSSION AND CONCLUSIONS

1. To study the development of the basic electrophysiological features of the CA1 pyramidal neurons between 9 and 19 postnatal days.
 - Passive membrane properties. Along this period the resting membrane potential becomes more hyperpolarised, the membrane resistance and time constant decrease and the membrane capacitance increases. These results are related to an increase in the dendritic arborisation (Pokorny & Yamamoto 1981a; Pokorny & Yamamoto 1981b; Schwartzkroin & Kunkel 1982) and the density of ionic channels which are normally open at membrane potentials around rest (Vasilyev & Barish 2002; Surges et al. 2006; Safiulina et al. 2008). The smaller membrane resistance along the development decreases the neuronal excitability.
 - The action potential (AP) waveform. The AP threshold becomes more hyperpolarised, the amplitude is higher and the half-width is wider due to the increment of the transient sodium current and the decrement of the potassium A-current (Klee et al. 1995; Costa 1996; Sánchez-Alonso et al. 2012). Furthermore, the current thesis demonstrates that the A-current participates in the depolarising phase is shown in the thesis, and that participation decreases along the development. The increment in the AP half-width during high frequency stimulation decreases along the development due to the A-current decrement and the increment of other potassium currents with slower

inactivation kinetics (Costa et al. 1994; Klee et al. 1995; Aoki & Baraban 2000; MacDonald et al. 2006; Guan et al. 2011; Sánchez-Alonso et al. 2012). Finally, the faster AP repolarization rate along the development allows to increase the maximum firing rate.

2. To study the involvement of the membrane potential in the neuronal excitability and the neuronal plasticity between 9 and 19 postnatal days.

These experiments show the importance of the subthreshold depolarization duration on the CA1 pyramidal neurons excitability. The AP isolated after a 5-minute-depolarization at -60 mV:

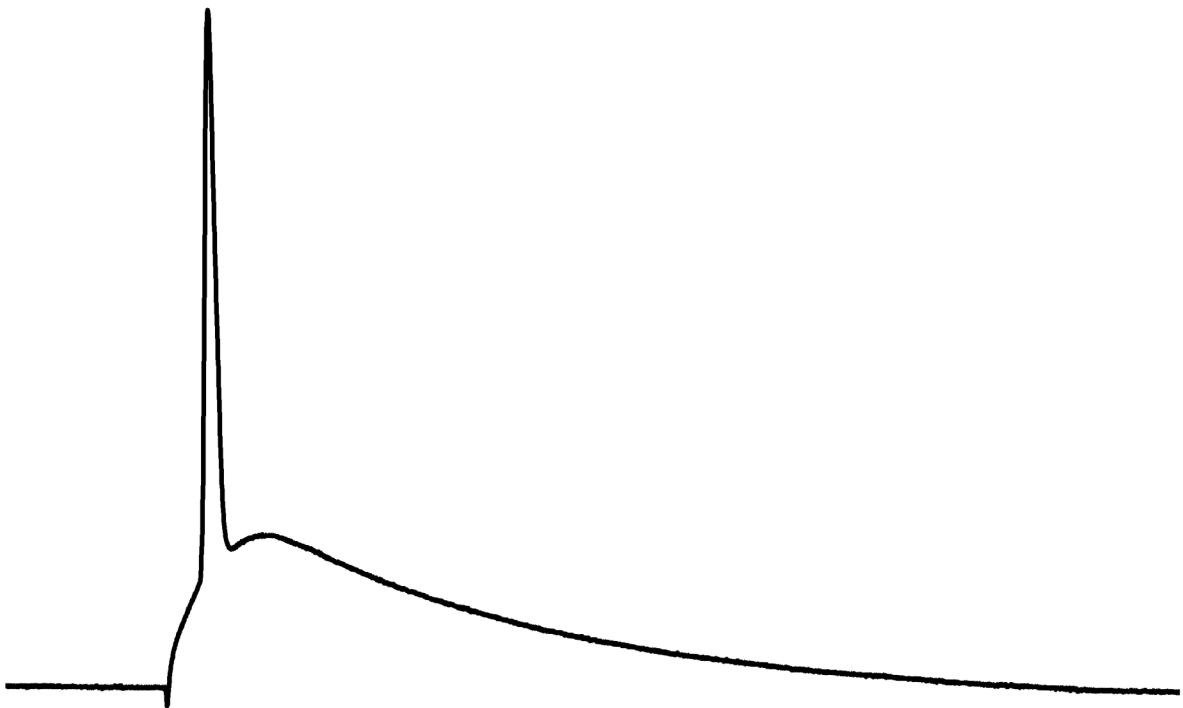
- In P9-12 group was wider than that isolated at -80 mV due to the A-current inactivation (Ma & Koester 1996; Kim et al. 2005; Gu et al. 2007).
- In P16-19 group, was narrower than that isolated at -80 mV, since a short-term intrinsic plasticity appears, which decreases the neuronal excitability. That plasticity has the next properties:
 - A. It is induced from depolarization duration lasting 15 seconds, and it is maximum when the depolarization is held at least for 5 minutes.
 - B. It is reverted when the membrane potential is hyperpolarised at -80 mV.
 - C. The induction is calcium-dependent. The calcium inward through T-type channels increases the potassium A-current and slows its inactivation time constant.
 - D. The calcium sensor is the Kv4 potassium channel interacting protein 3 (KChIP3). Other laboratories had previously described the existence of Cav3-Kv4 complexes in which the calcium entry through Cav3 channels modulates the Kv4 channels by KChIP3 (Anderson et al. 2010a; Anderson et al. 2013; Heath et al. 2014).
 - E. This plasticity described in CA1 pyramidal neurons is cell-type specific.

3. To study the role of the extracellular calcium on the neuronal excitability.

These experiments show that the decrease in the extracellular calcium levels evokes:

- On the AP waveform. The AP threshold becomes more hyperpolarised due to a leftward shift of the sodium-current activation curve (Hille 1968; Hahn & Campbell 1983; Hille 2001). In addition, the repolarising rate in the second half of the repolarising phase becomes slower due to a failure in the activation of potassium calcium-dependent currents such as BK-current (Lancaster & Nicoll 1987; Storm 1987; Shao et al. 1999; Gu et al. 2007; Sun et al. 2009).
- On the neuronal excitability. The decrease in the extracellular calcium levels increases the neuronal excitability and blocks the AP generation in response to high amplitude stimuli.
- In the spike after-depolarization (ADP). The ADP amplitude and the ADP half-width decrease due to a reduction in the T-type current (Magee & Carruth 1999; Jung et al. 2001; Metz et al. 2005; Sánchez-Alonso et al. 2010). Therefore, the firing pattern becomes regular spiking.

INTRODUCCIÓN



1. Hipocampo. Estructura y función.

El hipocampo es una región de la arquicorteza que se sitúa entre la paleocorteza olfatoria y la neocorteza. Generalmente, el término hipocampo se utiliza para referirse a la formación hipocampal, formada por el asta de Ammon, el giro dentado, el *subiculum* y el *prosubiculum*, dejando de lado la formación parahipocampal, que engloba la corteza entorrinal, el *presubiculum* y el *parasubiculum*. El asta de Ammon, o *cornu Ammonis* (CA), fue subdividido en cuatro áreas, desde CA1 hasta CA4, por Lorente de Nó (Lorente de Nó 1934). En una sección perpendicular al eje longitudinal del hipocampo: el área CA1 abarca casi toda la región superior, CA2 y CA3 forman la curva del arco del hipocampo, y CA4 se encuentra en la región inferior, adyacente al giro dentado. En el área CA1 se pueden apreciar varias capas en función de la organización celular existente (Figura I1):

- *Stratum alveus*: formado por los axones mielinizados de las neuronas piramidales hipocampales, por fibras del tracto alveolar procedentes de la corteza entorrinal y por proyecciones desde el *septum*.
- *Stratum oriens*: formado por las dendritas basales de las neuronas piramidales y por aferencias comisurales procedentes del hipocampo contralateral, que constituyen fibras mayoritariamente amielínicas. Contiene varios tipos de neuronas de axón corto, principalmente inhibitorias.
- *Stratum pyramidale*: contiene los somas densamente empaquetados de las neuronas piramidales, que constituyen el principal tipo neuronal del hipocampo. Además, en esta capa se localizan las células en cesto, que forman glomérulos alrededor de los somas de las piramidales.
- *Stratum radiatum*: formado por las ramas dendríticas apicales de las neuronas piramidales.
- *Stratum lacunosum-moleculare*: formado por las ramificaciones de las dendritas apicales de las células piramidales.

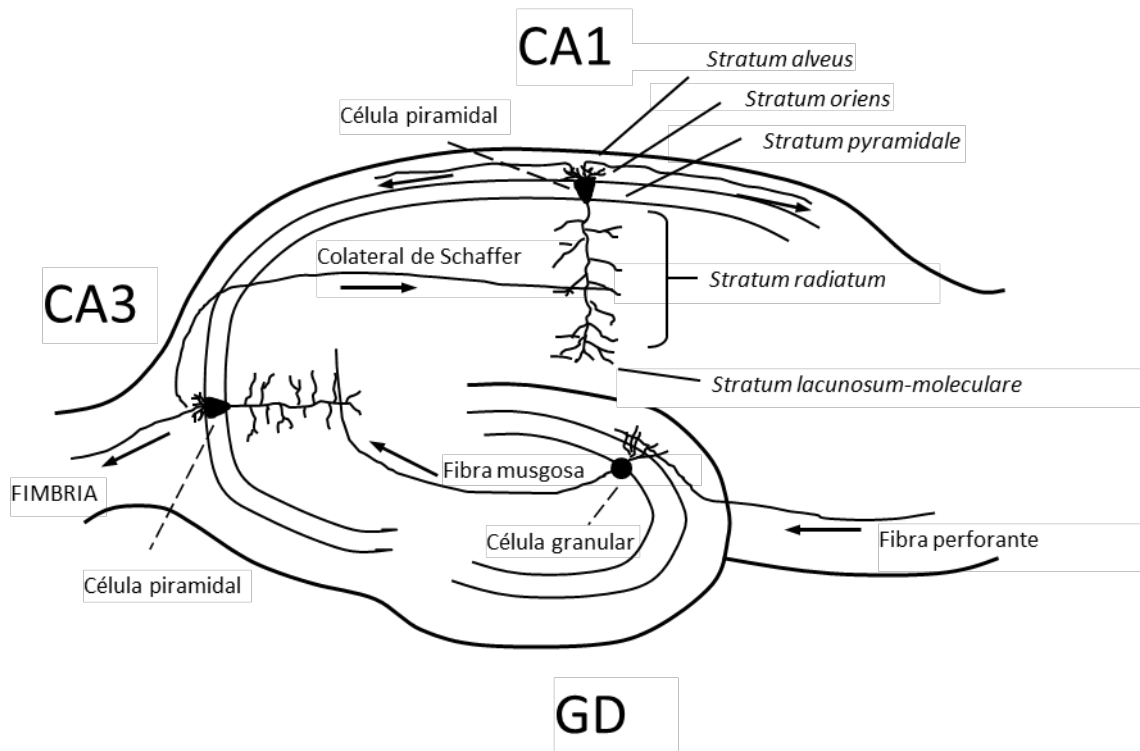


Figura I1. Esquema del hipocampo.

Esquema en el que aparecen representadas las principales áreas del hipocampo, así como el circuito trisináptico existente entre las células principales del giro dentado (GD), CA3 y CA1. Además se representan con más detalle las distintas capas del área CA1, región en la que se ha realizado el grueso del estudio presentado en esta tesis. Las flechas indican la dirección del flujo de información.

La arquitectura básica de conexiones del hipocampo consta de tres sinapsis excitatorias (detalladas en la Figura I1). Los axones de la vía perforante, procedentes de la corteza entorrinal, hacen sinapsis con las neuronas granulares de giro dentado. Los axones de estas neuronas granulares, a su vez, proyectan hasta el área CA3, constituyendo las fibras musgosas, que sinaptan con las dendritas de las neuronas piramidales. Por último, las neuronas piramidales de CA3 envían proyecciones hacia fuera del hipocampo a través de la fimbria, pero antes emiten las denominadas *colaterales de Schaffer*, que discurren por el *stratum radiatum* y establecen sinapsis *en passant* con las dendritas de las neuronas piramidales de CA1. También contactan con las piramidales de CA1 las fibras *comisurales*, que proceden de las neuronas piramidales del área CA3 del hipocampo contralateral. El neurotransmisor predominante en estas sinapsis es el glutamato.

También existen interneuronas inhibitorias, que emplean como neurotransmisor el GABA (ácido γ -aminobutírico), que sinaptan con las neuronas piramidales, y que son activadas

de forma recurrente por axones colaterales de las neuronas piramidales (Andersen et al. 1964).

Se considera que el hipocampo está funcionalmente relacionado con la memoria y el aprendizaje. En roedores es bien conocido el papel del hipocampo en la memoria, habiéndose mostrado su implicación en el aprendizaje espacial (Morris et al. 1982; Knierim et al. 2006; Neunuebel & Knierim, 2014) y en algunas formas de aprendizaje no espacial (Moyer et al. 1990; Eichenbaurn 2004; Squire et al. 2004). En los seres humanos se conocen sus funciones a través del estudio de lesiones debidas a cirugía o a procesos degenerativos o vasculares. Estas lesiones suelen producir cuadros de amnesia anterógrada, consistentes en deficiencias en la adquisición de nuevas memorias.

2. El potencial de acción.

2.1. Bases del estudio del potencial de acción.

Los estudios datan de la segunda mitad del siglo XIX, cuando Emil du Boys-Reymond realizó una serie de experimentos en los que ponía de manifiesto que la propagación de los impulsos nerviosos era de naturaleza eléctrica, y no química como defendían otros investigadores (du Boys-Reymond 1887). Algunos años más adelante Julius Bernstein formuló la hipótesis de la membrana, según la cual las células excitables estarían rodeadas de una membrana que, durante el estado de reposo, sería permeable selectivamente a los iones de potasio, explicando la negatividad del potencial de la membrana en reposo debido a que el potasio, que presenta una mayor concentración en el interior de la célula, tendía a salir de ella gracias al gradiente de difusión, produciéndose una diferencia de potencial entre el exterior y el interior celular (Bernstein 1902; Bernstein 1912). Durante el impulso nervioso, sin embargo, Bernstein proponía que la permeabilidad de la membrana a otros iones se incrementaría drásticamente, y que se produciría una “ruptura de la membrana”. Según esta hipótesis, durante la generación de los potenciales de acción (PAs), la concentración de aniones y cationes tanto en el exterior como en el interior de la célula se equipararían y, por lo tanto, la negatividad del potencial de la membrana desaparecería (Bernstein 1902; Bernstein 1912). A mediados del siglo XX, tras la aparición de los registros intracelulares, se observa que el potencial de la membrana llega a valores positivos similares a los del potencial de equilibrio

para el sodio cuando se registra el PA (Hodgkin & Huxley 1939; Hodgkin & Huxley 1945), sugiriendo la importancia de este ion en la generación de los PAs.

Posiblemente los descubrimientos más importantes en relación con el estudio de los PAs fueron realizados en 1952 por Hodgkin y Huxley en el axón gigante del calamar. Estos autores, haciendo uso de la técnica de fijación de voltaje (*voltage-clamp*), llevaron a cabo los primeros registros de las corrientes que fluyen a través de la membrana durante los PAs. Gracias a esta técnica los autores demostraron que, aplicando pulsos despolarizantes, se produce una rápida corriente de entrada seguida de una corriente de salida de desarrollo más lento y que, fijando el voltaje a un potencial de la membrana cercano al potencial de equilibrio para el sodio (aproximadamente +60 mV en estos experimentos), la corriente de entrada desaparece, mientras que la corriente de salida se mantiene (Hodgkin & Huxley 1952 a). Con el fin de demostrar claramente la importancia del sodio como la corriente de entrada, sustituyeron el cloruro sódico extracelular por cloruro de colina, y observaron que la corriente de entrada disminuyó drásticamente. En cuanto a las corrientes de salida, demostraron que además de no verse afectadas por la perfusión con la solución salina baja en sodio, presentaban un potencial de equilibrio muy negativo, por lo que concluyeron que dichas corrientes se producían por la salida de potasio hacia el exterior de las células (Hodgkin & Huxley 1952 a).

Aplicando la ley de Ohm a los registros obtenidos mediante la fijación de voltaje, Hodgkin y Huxley realizaron estimaciones de las conductancias de sodio y potasio en cada pulso de voltaje, lo cual les permitió estudiar en profundidad las cinéticas de dichas conductancias. Con estos análisis, los autores encontraron que ante un pulso despolarizante sostenido, la conductancia al sodio primero aumentaba rápidamente (activación) y luego disminuía más lentamente (inactivación) a pesar de mantenerse el potencial de la membrana en valores despolarizados, demostrando que las conductancias de sodio podían presentar diferentes estados (Hodgkin & Huxley 1952a; Hodgkin & Huxley 1952b). En relación a esto, los autores observaron que para recuperar la conductancia de sodio previamente inactivada, había que repolarizar de nuevo la membrana durante varios milisegundos para que esta conductancia pudiera volver a activarse, y que dependiendo del potencial de la membrana, la recuperación era más o menos rápida, explicando el porqué del período refractario para la generación de otros PAs (Hodgkin & Huxley 1952b; Hodgkin & Huxley 1952c).

Con estos estudios y la formulación del modelo matemático conocido hoy día como modelo de Hodgkin-Huxley se llega a la conclusión de que los impulsos nerviosos son

descargas eléctricas controladas por una conductancia selectiva a diversos iones y que estas conductancias presentan diferentes estados. Tras una breve despolarización, el potencial de la membrana tendería a repolarizarse lentamente siguiendo las propiedades pasivas de la membrana. Sin embargo, la generación del PA presenta las siguientes particularidades:

- Se produce un bucle autorregenerativo de activación de conductancias de sodio a medida que el potencial de la membrana se despolariza, llevando el potencial de la membrana hacia valores próximos al potencial de equilibrio del sodio, y por tanto dando lugar a una despolarización mucho mayor que la producida propiamente por el estímulo inicial.
- Antes de alcanzar el pico del PA, las conductancias de sodio comienzan a inactivarse y empiezan a aparecer las corrientes de potasio, que también se activan con la despolarización pero que ejercen su máximo efecto después de las corrientes de sodio coincidiendo con la fase de repolarización, debido a que su cinética de activación es más lenta. De este modo, las conductancias de potasio repolarizan el potencial de la membrana hacia valores incluso más hiperpolarizados que el potencial de reposo de la membrana, estabilizándose finalmente en torno al potencial de reposo.

Conviene tener en cuenta que aunque el potencial de la membrana retorna a valores similares a los del potencial de la membrana en reposo tras la generación PA, la concentración iónica del interior celular se alteraría poco a poco debido a la entrada de sodio y a la salida de potasio. Por lo tanto, hay mecanismos que recuperan las concentraciones iniciales de estos iones, y la principal proteína encargada de este proceso es el intercambiador Na^+/K^+ -ATPasa (Glynn 2002).

2.2. Corrientes que intervienen en el potencial de acción.

En las décadas siguientes a los análisis realizados por Hodgkin y Huxley, se ha aclarado que la mayoría de los tipos neuronales tienen muchas más conductancias que las descritas en el axón gigante del calamar. Las neuronas del sistema nervioso central de vertebrados expresan al menos una docena de tipos diferentes de canales iónicos dependientes de voltaje en la membrana (Llinas 1988; Hille 2001), y las neuronas del cerebro de mamíferos tienen: 2 o 3 tipos de corriente de sodio, 4 o 5 corrientes de calcio dependientes de voltaje, al menos 4 o 5 corrientes

de potasio dependientes de voltaje, al menos 2 o 3 corrientes de potasio dependientes de calcio y otras corrientes (Bean 2007).

La morfología de los PAs cambia considerablemente entre los distintos tipos neuronales en el cerebro de mamíferos. Por ejemplo, en el hipocampo y la corteza, los PAs generados por las interneuronas tienen mucha menor duración que los generados por las neuronas piramidales (Bean 2007). En las neuronas de mamíferos, los PAs suelen registrarse en los somas en las rodajas de cerebro, donde los axones y el árbol dendrítico se encuentran bastante preservados (Bean 2007). En la mayoría de las neuronas el PA se genera en el cono axónico, a una distancia suficiente como para que el PA registrado en soma pueda verse algo afectado porque el voltaje no es uniforme en ambos compartimentos (Dodge & Cooley 1973; Bean 2007; Beck & Yaari 2008; Kole & Stuart 2008). Las dendritas también influyen en la morfología del PA registrado en soma, en parte sirviendo como condensador que enlentece los PAs, y también con un papel importante en la generación de despolarizaciones postpotencial (Bean 2007). La Figura I2 muestra la morfología básica de un PA en mamíferos.

Como observaron Hodgkin y Huxley, la principal contribución de los canales de sodio dependientes de voltaje en la generación del PA es la activación de una corriente de entrada explosiva y autorregenerativa durante la fase despolarizante. Sin embargo, las cinéticas de las corrientes de sodio varían entre los distintos tipos neuronales (Bean 2007). Se ha detectado la expresión de los canales Nav1.1, Nav1.2 y Nav1.6 en el cono axónico (Boiko et al. 2001; Boiko et al. 2003; Ogiwara et al. 2007), por lo que la contribución de cada isoforma en los diferentes tipos neuronales puede explicar la variedad de cinéticas descritas. En las neuronas piramidales de CA1 parece tener un papel fundamental la isoforma Nav1.6 en la generación del PA (Royer et al. 2008). En algunas neuronas aparece un componente de la corriente de sodio sensible a tetrodotoxina inmediatamente después del PA y que promueve la generación de un segundo PA. Esta se conoce como la corriente resurgente de sodio, la cual se activa transitoriamente por pulsos despolarizantes de alta intensidad después de la repolarización, debido a que esta corriente tiene un mecanismo de inactivación diferente (Bean 2007).

Seguidamente a la fase de despolarización, aparece la fase de repolarización, la cual Hodgkin y Huxley demostraron que es debida a la salida de potasio. En la mayoría de las neuronas centrales hay una gran variedad de corrientes de potasio dependientes de voltaje. Sin embargo sólo algunas de estas corrientes se activan durante los PAs normales (Bean 2007). En las neuronas piramidales del hipocampo y de la corteza, al menos tres corrientes de potasio tienen un papel principal en la repolarización del PA: las corrientes dependientes de voltaje

tipo A y tipo D, y la corriente dependiente de calcio de alta conductancia o tipo BK (Mitterdorfer & Bean 2002; Bean 2007). La corriente tipo A es una corriente de activación e inactivación rápida producida por el potasio que sale por la familia de los canales Kv4 y que tiene un papel importante en el primer tercio de la repolarización (Connor & Stevens 1971a; Connor & Stevens 1971b; Mitterdorfer & Bean 2002). La corriente tipo D, producida a través de los canales Kv1, también es una corriente de activación rápida, pero tiene una cinética de inactivación lenta, propiedad por la que es importante en el control del retraso en la generación del potencial de acción, además de participar en el primer tercio de la fase repolarizante (Storm 1988; Mitterdorfer & Bean 2002; Johnston et al. 2010). La corriente tipo BK es importante en la segunda mitad de la fase repolarizante y en el control del disparo repetitivo, y se genera a través de los canales KCa1 o BK (Lancaster & Adams 1986; Lancaster & Nicoll 1987; Storm 1987; Poolos & Johnston 1999; Sun et al. 2009). Durante la segunda mitad de la fase repolarizante también interviene una de las corrientes rectificadoras retardadas de potasio generada por los canales Kv2 (Du et al. 2000; Johnston et al. 2010). En numerosas neuronas, incluidas las del hipocampo, aumenta la duración del PA cuando se produce un disparo de alta frecuencia, debido a la inactivación acumulativa de los canales de potasio (Ma & Koester 1996; Kim et al. 2005; Gu et al. 2007). En esta situación, se activan algunas corrientes de potasio que en condiciones normales tienen menor participación, como algunas corrientes rectificadoras retardadas y las corrientes dependientes de calcio (Bean 2007). En algunas neuronas conocidas como de disparo rápido (*fast-spiking neurons*), como las interneuronas del hipocampo y corteza o las neuronas de Purkinje, una corriente mediada por los canales Kv3 parece constituir la corriente de potasio dependiente de voltaje más importante que fluye durante la repolarización del PA (Bean 2007). Esta corriente tiene una rápida activación, una rápida desactivación y una inactivación lenta (Zhang & Mcbain 1995; Du et al. 1996; Martina et al. 1998; Rosato-Siri et al. 2015; Taskin et al. 2015), por lo que la duración de los PAs de estas neuronas es tan corta que pueden disparar a frecuencias elevadas sin que la morfología de los PAs se vea muy alterada.

En las neuronas de mamíferos, además hay múltiples tipos de canales de calcio dependientes de voltaje que tienen importancia para la morfología del PA y el patrón de disparo (Bean 2007). Los canales de calcio se comienzan a activar cuando el PA ha alcanzado casi su pico, y las corrientes de calcio aumentan durante la fase repolarizante, cuando los canales ya están abiertos y aumenta la fuerza electromotriz de entrada de calcio (Bean 2007). Un hecho interesante es que, a pesar de ser corrientes de entrada, el bloqueo de los canales de calcio suele estar asociado con un incremento de la duración del PA. Esto es debido al

potencioso y rápido acoplamiento entre la entrada de calcio y la rápida activación de los canales de potasio dependientes de calcio tipo BK, debido a la formación de complejos macromoleculares entre los canales de potasio tipo BK y numerosos tipos de canales de calcio (incluyendo Cav1.2, Cav2.1, Cav2.2 y Cav3) (Berkefeld et al. 2006; Rehak et al. 2013).

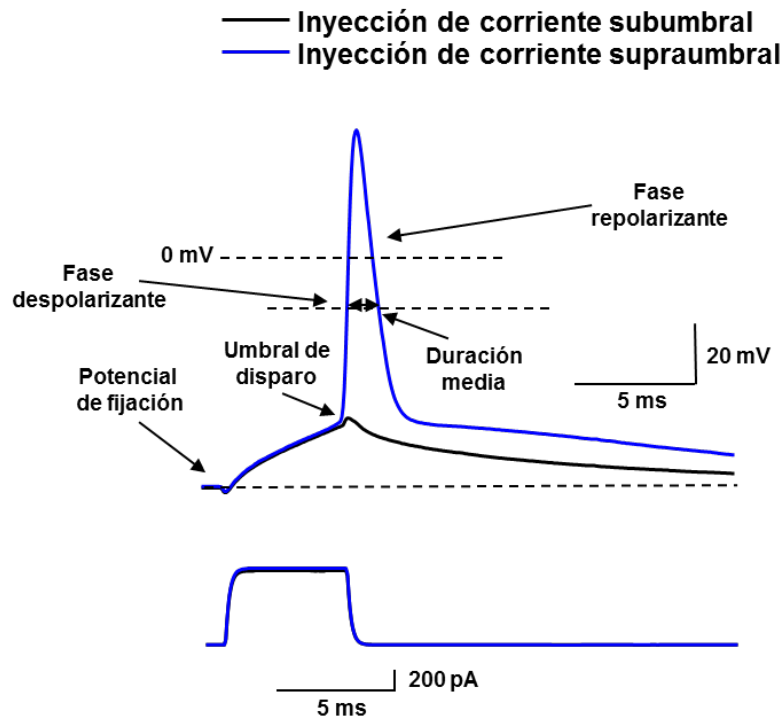


Figura I2. Parámetros del PA.

Registro representativo que muestra los parámetros comúnmente estudiados en la tesis de los PAs registrados en las neuronas piramidales de CA1 de rata tras la aplicación de un pulso de corriente de 5 ms (trazo azul). También se muestra la respuesta a una inyección de corriente subumbral (trazo negro).

- El umbral de disparo es el potencial de la membrana más negativo necesario para generar un PA el 50% de las veces que se inyecta corriente.
- La fase despolarizante alcanza una velocidad máxima en torno a potenciales de la membrana próximos a 0 mV.
- La duración del PA se mide al potencial de la membrana correspondiente al 50% de su amplitud máxima, medida que se conoce duración media.
- La fase repolarizante es mucho más lenta que la despolarizante. Por ello, suele ser la fase que más influye en la duración del PA.

Por último, hay que destacar que la capacidad que tienen las neuronas centrales para disparar PAs con una amplia variedad de frecuencias depende de múltiples corrientes subumbrales que aceleran o retardan la aproximación del potencial de la membrana al umbral de disparo. Entre estas corrientes subumbrales se encuentran las corrientes de potasio tipo A, tipo D y tipo M, la corriente persistente de sodio, la corriente de calcio de bajo umbral o tipo T y la corriente catiónica tipo H (Bean 2007).

3. Excitabilidad intrínseca.

3.1. Generalidades.

La relación entre las entradas y las salidas de un circuito neuronal como el que constituye el hipocampo, depende tanto de la conectividad sináptica que tiene el circuito, como de la excitabilidad propia de cada una de las neuronas que lo componen (Daoudal & Debanne 2003). La excitabilidad neuronal es un fenómeno multidimensional complejo que describe las vías por las que una neurona integra y responde a los estímulos. Depende del ensamblaje de diversas propiedades intrínsecas que incluyen el potencial de reposo, las conductancias de fuga (que determinan la resistencia de la membrana), la capacidad de la membrana, y las propiedades y distribución de los canales expresados en la membrana plasmática (Mozzachiodi & Byrne 2010). La excitabilidad puede definirse como la capacidad de la neurona para generar una señal de salida (el PA) a partir de una señal de entrada (Daoudal & Debanne 2003). Las señales de entrada comprenden los potenciales excitadores postsinápticos (PEPS) y los potenciales inhibidores postsinápticos (PIPS), siendo los primeros los encargados de facilitar la respuesta de salida, mientras que los PIPS se oponen a la generación del PA. El proceso de integración de las señales de entrada y generación de una señal de salida requiere de la apertura de canales iónicos dependientes de voltaje ante una sinapsis excitatoria, y este acoplamiento entre el PEPS y el PA es esencial para la correcta función neuronal. Aunque el concepto es bastante simple, el acoplamiento entrada-salida engloba una serie de operaciones complejas y una modulación de la morfología del PEPS por canales iónicos localizados en dendritas, soma y axón (Daoudal & Debanne 2003). Por tanto, la importancia de estos procesos no reside únicamente en el cono axónico, región donde se suele iniciar el PA, sino que también hay canales dependientes de voltaje de sodio, potasio y calcio en dendritas y soma, los cuales juegan un papel crucial. Estos canales amplifican (corriente persistente de sodio o corriente de calcio tipo T) o atenúan

(corriente de potasio tipo A o corriente catiónica tipo H) la amplitud del potencial sináptico (Daoudal & Debanne 2003; Carter et al. 2012). Por tanto en las dendritas y soma se produce una modulación de señales de entrada que se propagan, para una posterior integración y generación de una señal de salida usualmente en el cono axónico.

La excitabilidad intrínseca varía durante el desarrollo en modelos animales de patologías del sistema nervioso (tales como epilepsia, Alzheimer, dolor neuropático, encefalomiелitis autoinmune, estrés...) y en la plasticidad sináptica (Weiss et al. 2005; Beck & Yaari 2008; O'Leary et al. 2010; Brown et al. 2011; Hall et al. 2015). Asimismo, el aumento en la excitabilidad de las neuronas hipocampales facilita la plasticidad sináptica y el aprendizaje dependiente del hipocampo (Lopez de Armentia et al. 2007; Oh et al. 2009).

3.2. Relaciones entre el potencial de reposo y el umbral de disparo.

La excitabilidad de una neurona depende de su potencial de reposo y del umbral de disparo. Las neuronas pueden descargar espontáneamente o permanecer silentes hasta que se produce una despolarización suficiente como para llevar el potencial de la membrana hasta el umbral en el que se genera el PA. Por tanto, la diferencia entre el potencial de reposo y el potencial umbral es un factor crucial que gobierna la transmisión de la actividad entre neuronas sinápticamente conectadas (Fricker et al. 1999).

Solventar esta diferencia entre el potencial de reposo y el potencial umbral es un proceso complejo, pues la intensidad de estímulo requerida no posee un único valor. Ya en 1907, Louis Lapicque demostró, estimulando el nervio ciático de ranas, que el voltaje necesario para contraer el músculo gastrocnemio era menor cuanto mayor era la duración del estímulo (Lapicque 1907). La relación exponencial negativa entre la duración y la intensidad del estímulo resulta de los parámetros que describen la carga capacitiva hasta alcanzar el umbral de voltaje (Figura I3). El propio Lapicque definió los términos reobase y cronaxia como medidas de la excitabilidad de los nervios (Lapicque 1926):

- La reobase se define como la mínima intensidad del estímulo que es capaz de producir una despolarización umbral (es decir, alcanzar el umbral de disparo del PA). Coincide con la intensidad del estímulo correspondiente a la asíntota horizontal de la Figura I3.

- La cronaxia es la duración mínima del estímulo que se requiere para alcanzar una despolarización umbral con un estímulo cuya intensidad es el doble que la reobase (Figura I3).

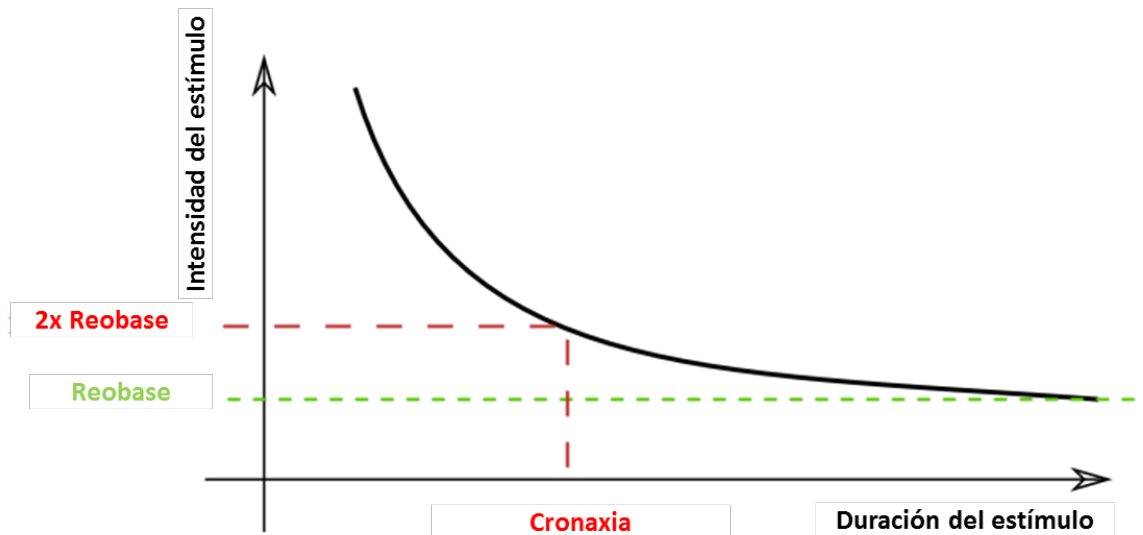


Figura I3. Representación de la ley de Lapicque.

Gráfica que muestra la relación que estableció Lapicque (1907) entre la intensidad y la duración del estímulo necesario para generar un PA, considerando que Reobase es la mínima intensidad de estímulo capaz de producir una despolarización umbral y Cronaxia es la duración mínima del estímulo necesaria para alcanzar una despolarización umbral cuando la intensidad de estimulación es 2x Reobase.

En 1936 Archibald Vivian Hill demostró, de nuevo con el nervio ciático de ranas, que durante despolarizaciones prolongadas se producía una acomodación que se caracteriza por la disminución de la excitabilidad a lo largo del tiempo (Hill 1936). Los estudios posteriores de Hodgkin y Huxley con el axón gigante del calamar mostraron que esta acomodación correspondía a la inactivación de la corriente de sodio y a la activación lenta de corrientes de potasio (Hodgkin & Huxley 1952a).

Estudios posteriores profundizaron en la relación intensidad-duración del pulso para estudiar con más detalle las condiciones umbrales para la generación del PA (Noble & Stein 1966; Bostock 1983; Fricker et al. 1999). Fricker y colaboradores demostraron, ya con registros de *patch-clamp*, que a pesar de que el umbral de corriente cambiaba mucho con la duración del estímulo siguiendo la ley de Lapicque, el umbral de voltaje permanecía casi invariable, independientemente de la intensidad y duración del estímulo (Fricker et al. 1999).

3.3. Importancia de los iones divalentes para la excitabilidad neuronal.

Los iones divalentes que se encuentran en la solución extracelular tienen un papel destacado en el control de la excitabilidad neuronal. En 1957, Frankenhaeuser y Hodgkin observaron en el axón gigante del calamar que al disminuir la concentración extracelular de calcio se producía un aumento de la corriente de entrada de sodio al desplazar a la izquierda la dependencia de voltaje de la activación de sus canales (Frankenhauser & Hodgkin 1957). Similar desplazamiento se describió en los canales dependientes de voltaje de potasio. Algunos años más tarde, Adelman y Moore propusieron que una disminución en la concentración extracelular de iones divalentes desplaza la apertura de los canales de sodio a potenciales más negativos (Adelman & Moore 1961). Posteriormente se demostró que la concentración extracelular de iones divalentes modula la dependencia de voltaje de la activación y la inactivación de los canales implicados en la corriente transitoria de sodio, y las curvas de activación de otros canales como los implicados en las corrientes de potasio tipo A y otras rectificadoras retardadas o la corriente catiónica tipo H (Hille 1968; Hahn & Campbell 1983; Mayer & Sugiyama 1988; Elinder et al. 1996; Hille 2001).

En general, el aumento de la concentración extracelular de divalentes estabiliza la excitabilidad: cierra canales dependientes de voltaje, aumenta la resistencia de la membrana en reposo y despolariza el umbral de excitación eléctrica de nervios y músculos. La disminución de los niveles de divalentes produce efectos contrarios, incluyendo hiperexcitabilidad de nervios y músculos, una condición observada en clínica en pacientes con hipoparatiroidismo (Hille 2001).

Frankenhaeuser y Hodgkin propusieron la teoría del potencial de superficie para explicar este efecto que tenía el calcio sobre la excitabilidad neuronal (Frankenhauser & Hodgkin 1957). Según esta teoría, los iones divalentes serían absorbidos por la cara externa de la membrana plasmática, creando un campo eléctrico que modificaría la distribución de otras partículas cargadas presentes en la membrana sin cambiar la diferencia de potencial entre el interior y el exterior de la neurona. De este modo, los iones divalentes neutralizan las cargas negativas de diversas moléculas insertas en la cara externa de la membrana, en los propios canales iónicos o en las proximidades de los sensores de voltaje de los canales (como fosfatos, ácido siálico, lípidos cargados, aminoácidos cargados y otros residuos hidrofóbicos de cadenas proteicas), produciendo un efecto de apantallamiento que modifica el campo eléctrico que

experimentan estos sensores de voltaje (Elinder et al. 1996; Hille 2001; Isaev et al. 2012). En ausencia de calcio (u otro ion divalente), las cargas de las moléculas presentes en la cara externa de la membrana plasmática se quedan libres, estableciéndose un potencial de campo negativo (conocido como potencial de superficie) que altera el campo eléctrico dentro de la membrana. Los sensores de voltaje de los canales detectan este cambio de forma equivalente a una despolarización, por lo que los canales de sodio, potasio y calcio tenderían a abrirse (Hille 2001) (Figura I4).

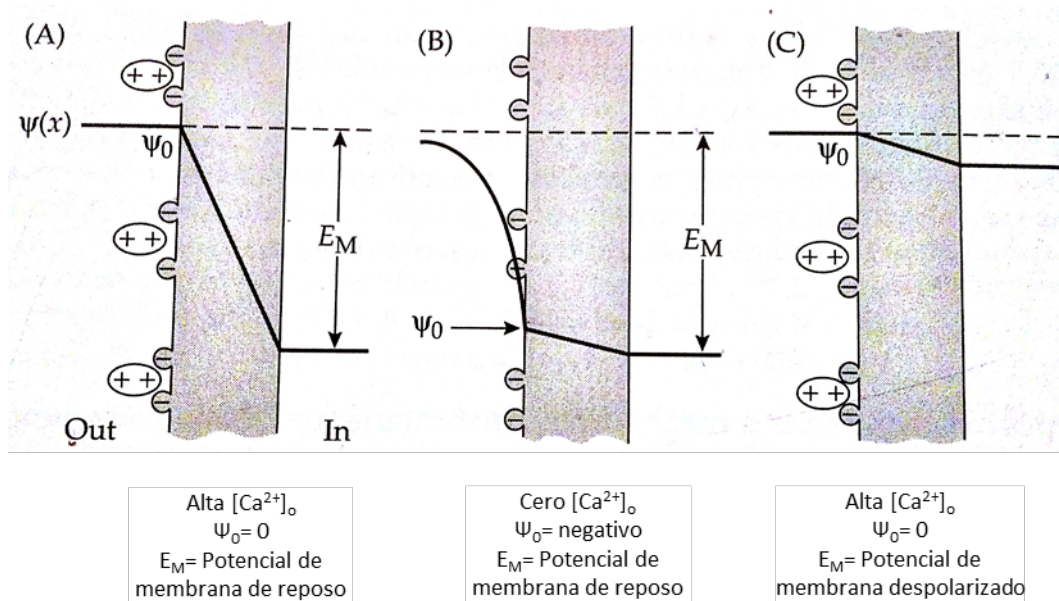


Figura I4. Hipótesis del potencial de superficie.

Simplificación de la hipótesis del potencial de superficie, representada por Hille (2001), donde se muestra el perfil del potencial eléctrico $\psi(x)$, próximo a una membrana que presenta cargas negativas en su cara externa y que está bañada en una solución electrolítica. ψ_0 representa el potencial eléctrico en la cara externa de la membrana. El potencial de la membrana (E_M) está definido como la diferencia de potencial entre la solución extracelular y la solución intracelular.

La fuerza del campo eléctrico dentro de la membrana es directamente proporcional a la pendiente de la curva $\psi(x)$. Con una solución extracelular con alta concentración de calcio (A), los iones calcio neutralizan las cargas negativas de la cara externa de la membrana, de modo que ψ_0 es igual a $\psi(x)$ en la solución extracelular, y la fuerza del campo eléctrico dentro de la membrana coincide con E_M .

Con una solución extracelular sin calcio (B), las cargas negativas quedan libres, de modo que el ψ_0 es más negativo que $\psi(x)$ en la solución extracelular. Por tanto, la fuerza del campo eléctrico dentro de la membrana es menor que E_M . El valor del campo en la membrana sería equivalente al observado tras despolarizar la membrana cuando la concentración extracelular de calcio es alta (C).

La teoría del potencial de superficie tiene ciertas limitaciones (Hille 2001):

- Los cálculos sobre el potencial de superficie se realizaron para una superficie plana y cuyas cargas se distribuyen uniformemente. Sin embargo, los canales no están cargados de manera uniforme sobre una superficie plana, y se desconoce la geometría de las principales cargas y de los sitios donde se encuentran con respecto de los sensores. Por tanto, sería más correcto utilizar potencial local en vez de potencial de superficie. No obstante, el conocimiento actual sobre la estructura tridimensional de algunos canales permitiría realizar nuevos cálculos del potencial local generado.
- No todos los canales sufren unos cambios en su dependencia de voltaje de igual magnitud. Por ejemplo, el desplazamiento producido en las curvas de activación e inactivación del sodio son mayores que el desplazamiento de la curva de activación de potasio (Frankenhauser & Hodgkin 1957; Hille 1968). Además, la teoría del potencial de superficie simple predeciría que todos los parámetros cinéticos deberían desplazarse igualmente, y esto no siempre ocurre.

Admitiendo estas limitaciones, Gilly y Armstrong propusieron una teoría de acciones dinámicas en la que los iones multivalentes se unen y desunen a las cargas negativas en los estados cinéticos (Gilly & Armstrong 1982a; Gilly & Armstrong 1982b). Con esta teoría describieron cómo el zinc desplaza la activación de los canales de sodio pero no la desactivación. Sugirieron que el zinc se atraía a un componente cargado de la compuerta que está cerca de la capa externa de la membrana en situación de reposo pero que durante la activación migra al interior.

3.4. Evolución de la excitabilidad neuronal durante el desarrollo.

La maduración postnatal de la excitabilidad intrínseca acompaña e interactúa con otros programas de desarrollo que subyacen al crecimiento neuronal, la ramificación dendrítica y la formación de conexiones sinápticas. Durante estas primeras semanas de desarrollo, la excitabilidad de las neuronas piramidales del área CA1 aumenta (Chen et al.

2005). En este período, diversos autores han descrito un aumento de la amplitud de los PAs y un incremento de la velocidad de su fase repolarizante, además de una hiperpolarización de su umbral de disparo (McCormick & Prince 1987; Zhang et al. 1991; Spigelman et al. 1992; Isagai et al. 1999; Sánchez-Alonso et al. 2010; Sánchez-Alonso et al. 2012). Relacionado con la evolución de estos parámetros, Huguenard y colaboradores observaron un incremento de las corrientes de sodio sensibles a tetrodotoxina en neuronas corticales (Huguenard et al. 1988). En años posteriores, otros autores reafirmaron este incremento en las corrientes persistente y transitoria de sodio (Costa 1996; Potthoff & Dietzel 1997; Lunko et al. 2014). Además, estudios de inmunohistoquímica mostraron un incremento de la expresión del canal Nav1.6 en el cono axónico y en los nodos de Ranvier durante las primeras semanas del desarrollo postnatal (Boiko et al. 2001; Boiko et al. 2003).

Por otra parte, diversos autores han publicado que durante el desarrollo no sólo aumenta la amplitud de los PAs, sino que también disminuye su duración, debido a que aumenta la velocidad de repolarización (McCormick & Prince 1987; Spigelman et al. 1992; Baraban & Schwartzkroin 1996; Isagai et al. 1999; Sánchez-Alonso et al. 2010). Este aumento en la velocidad de la fase repolarizante se ha relacionado con el incremento que se produce en algunas corrientes de potasio durante el desarrollo, como ocurre con las corrientes tipo D, otras corrientes rectificadoras retardadas y la corriente tipo BK (Klee et al. 1995; Kang, et al. 1996a; Kang, et al. 1996b; Aoki & Baraban 2000; Sánchez-Alonso et al. 2012; Giglio & Storm 2014). No obstante, hay cierta controversia sobre la evolución de la duración del PA durante el desarrollo, pues Sánchez-Alonso y colaboradores observaron que las neuronas más inmaduras generaban PAs de menor duración debido a que durante el desarrollo disminuía la corriente de potasio tipo A al disminuir la expresión de los canales Kv4.2 y Kv4.3 (Sánchez-Alonso et al. 2012).

También se produce durante el desarrollo un incremento de otras corrientes activas a potenciales de la membrana próximos al de reposo, como las corrientes tipo M y tipo H (Vasilyev & Barish 2002; Surges et al. 2006; Safiulina et al. 2008). El incremento de estas dos corrientes, junto con el incremento de las implicadas en la generación y repolarización del PA, permite que durante el desarrollo postnatal pueda aumentar la frecuencia máxima de disparo (Sánchez-Alonso et al. 2012).

4. Patrón de disparo de las neuronas piramidales de CA1.

4.1. Tipos de patrón de disparo.

Las neuronas pueden presentar dos tipos bien diferenciados de patrón de disparo de los PAs (Schwartzkroin 1975) (Figura I5):

- Disparo regular, caracterizado por generar PAs con una frecuencia de disparo uniforme durante la despolarización.
- Disparo en ráfagas, caracterizado por generar los PAs en agrupaciones de 2, 3 o más, y de forma irregular durante la despolarización.

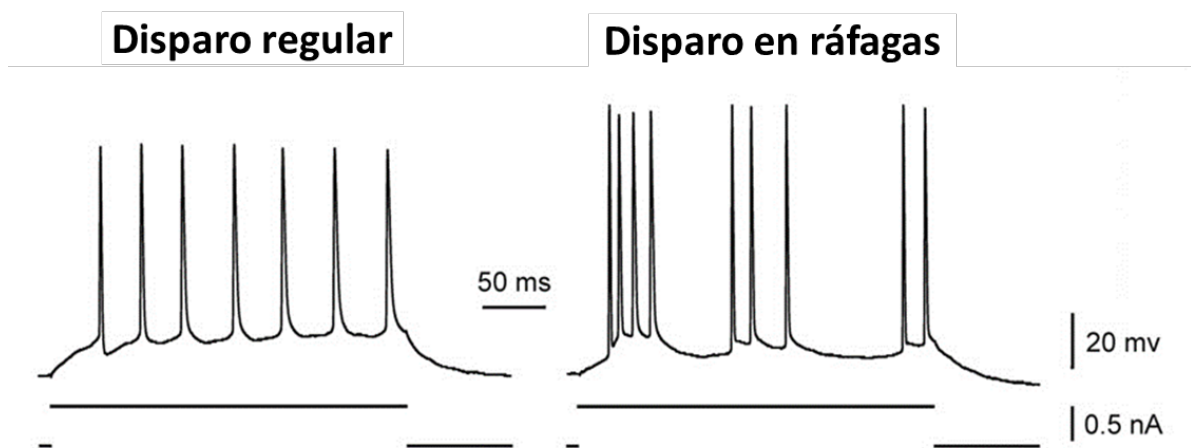


Figura I5. Posibles patrones de disparo de las neuronas.

Registros representativos de un patrón de disparo regular (izquierda) y de un patrón de disparo en ráfagas (derecha) (Sánchez-Alonso et al. 2010).

El comportamiento intrínseco predominante en las neuronas piramidales de CA1 es el disparo regular, aunque también hay neuronas piramidales que disparan en ráfagas (Masukawa et al. 1982; Jarsky et al. 2008; Graves et al. 2012). Sin embargo, en respuesta a entradas sinápticas las neuronas piramidales pueden cambiar su patrón de disparo de regular a en ráfagas o viceversa (Brown & Randall 2009; Graves et al. 2012). El cambio de un patrón a otro puede alterar drásticamente la forma de procesar la información (Magee & Carruth 1999). La ráfaga de PAs puede ser una unidad de información en sí misma, como sugiere el trabajo de Izhikevich y colaboradores, en el cual se pone de manifiesto cómo la ráfaga de PAs es un mecanismo efectivo

de comunicación entre neuronas (Izhikevich et al. 2003). La duración de la ráfaga, el número de PAs por ráfaga o la frecuencia de las mismas pueden servir como formas específicas de codificación (Harris et al. 2001; Kepecs et al. 2002). Además, la capacidad de disparar de una forma u otra puede dar a la neurona la habilidad de regular dinámicamente la información a través del tren de PAs, modulando la eficacia sináptica (Brumberg et al. 2000).

En situaciones fisiológicas, el patrón de disparo predominante varía en distintas áreas cerebrales. Por ejemplo, se alterna entre regular y en ráfagas en el tálamo según el estado sueño-vigilia, o durante la transmisión del dolor visceral a la corteza cerebral. Este cambio entre un disparo regular a uno en ráfagas o viceversa parece ser también responsable de muchos desórdenes neurológicos. Por ejemplo, se observa un aumento del disparo en ráfaga en la epilepsia, mientras que una disminución podría asociarse con una red neuronal deprimida (Beck & Yaari 2008; Cheong et al. 2008; Graef et al. 2009; Chen et al. 2011). También se piensa que el disparo en ráfaga es importante en la consolidación de nuevos recuerdos, proceso en el que es necesaria la intervención del hipocampo (Cattaneo et al. 1981; Buzsaki 1989). De cualquier forma, el disparo en ráfaga en el hipocampo es importante tanto en el procesamiento como en el almacenamiento de la información neuronal (Magee & Carruth 1999) y tiene un papel fundamental durante el desarrollo de esta región.

4.2. Despolarización post-potencial y patrón de disparo en las neuronas piramidales de CA1.

En algunas neuronas piramidales de CA1, los PAs presentan tras la repolarización una despolarización post-potencial (ADP, *afterdepolarization potential*) (Kandel & Spencer 1961; Schwartzkroin 1975; Jensen et al. 1996; Bean 2007; Sánchez-Alonso et al. 2010). Existe una gran relación entre la amplitud y la duración de la ADP y el patrón de disparo regular o en ráfagas (Jensen et al. 1996; Chen et al. 2005; Metz et al. 2005; Jarsky et al. 2008; Sánchez-Alonso et al. 2010). En las neuronas con un patrón regular, o bien tras la repolarización del PA no hay una ADP o bien la ADP no es suficiente para alcanzar el umbral para generar un nuevo PA. En las neuronas con disparo en ráfagas, la ADP produce una despolarización suficiente como para disparar uno o varios PAs adicionales (Beck & Yaari 2008).

En la generación de la ADP intervienen distintos canales iónicos dependientes de voltaje (Figura I6). Estas corrientes se activan en rangos de voltaje similares a los de la ADP o se activan durante la despolarización producida por el PA, y sus canales permanecen abiertos a

pesar de la repolarización del potencial de la membrana (Beck & Yaari 2008). Las corrientes de calcio tipo T, tipo R y tipo L se encuentran entre las implicadas en la generación de la ADP, aunque fundamentalmente intervienen los canales de calcio de la corriente T debido a sus características: bajo umbral de activación y cinéticas lentas de desactivación (Randall & Tsien 1997; Su et al. 2002). Así, el bloqueo de los canales de calcio T y R con níquel inhibe el disparo en ráfaga en mucha mayor medida que el bloqueo de los canales de calcio L, N o P/Q (Magee & Carruth 1999; Metz et al. 2005; Sánchez-Alonso et al. 2010). Se ha propuesto la teoría de que la generación de un disparo en ráfagas se debe al reclutamiento de estos canales presentes en las dendritas apicales tras la llegada del PA somático retropropagado (Magee & Carruth 1999). La corriente de calcio genera unas espigas dendríticas de calcio que refuerzan la ADP del PA somático, provocando la generación de un disparo en ráfagas (Magee & Carruth 1999).

Sin embargo, otros autores consideran que los canales de la corriente persistente de sodio son los responsables de la mayor parte de la despolarización necesaria para generar el ADP en base al bloqueo de la generación de la ADP y el comportamiento en ráfagas al añadir los bloqueantes de la corriente persistente de sodio, TTX o riluzol (Jensen et al. 1996; Mattia et al. 1997; Su et al. 2001; Su et al. 2002; Yue et al. 2005; Chen et al. 2011). Estos autores apoyan la teoría de que la activación de la corriente persistente de sodio en el soma o en sus proximidades aumenta la ADP del PA somático a potenciales supraumbrales para generar un disparo en ráfagas. No obstante, otros autores también sugieren que la corriente persistente de sodio es necesaria para la propagación desde el soma a las dendritas de los PAs encargados de activar a los canales de calcio (Magee & Carruth 1999; Chen et al. 2005).

Además de estas corrientes despolarizantes, también algunas corrientes hiperpolarizantes que se activan a potenciales subumbrales modulan la amplitud y duración de la ADP. La principal corriente hiperpolarizante que participa es la corriente tipo M, a través de los canales Kv7 (Morin et al. 1998; Yue & Yaari 2004; Chen & Yaari 2008; Safiulina et al. 2008; Brown & Passmore 2009). Los canales Kv7 colocalizan con los canales implicados en la corriente persistente de sodio cerca de la región somática de las neuronas piramidales de CA1, y juntas modulan el patrón de disparo (Yue et al. 2005; Beck & Yaari 2008). Sin embargo, se ha observado que tras el bloqueo de los canales de potasio, específicamente los de la corriente tipo A, se ve incrementado el patrón de disparo en ráfagas (Magee & Carruth 1999; Chen et al. 2005; Beck & Yaari 2008), aunque Metz y colaboradores también observaron una disminución de la ADP producida por la corriente tipo D (Metz et al. 2007).

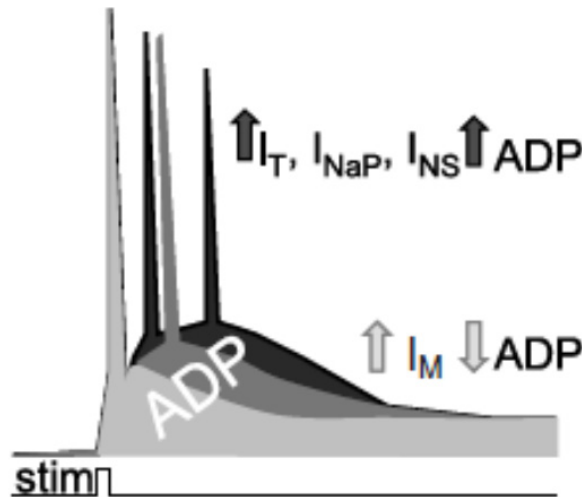


Figura I6. Corrientes implicadas en la generación de la ADP.

En la figura se han superpuesto tres despolarizaciones postpotenciales generadas a partir de tres PAs idénticos. I_T = corriente T de calcio; I_{NaP} = corriente persistente de sodio; I_{NS} = corriente catiónica no específica; I_M = corriente M de potasio. (Schorge & Walker 2009).

4.3. Evolución del patrón de disparo durante el desarrollo.

Durante el desarrollo postnatal, el patrón de disparo de las neuronas es diferente al que tienen en su estado adulto. En las primeras semanas postnatales el ADP aumenta su duración (Chen et al. 2005) y amplitud (Sánchez-Alonso et al. 2010). Estos acontecimientos se relacionan con una tendencia de las neuronas piramidales de CA1 del hipocampo a manifestar disparos con un patrón en ráfaga (Costa et al. 1991; Chen et al. 2005; Sánchez-Alonso et al. 2010). Así, Chen y colaboradores publicaron que el porcentaje de células piramidales de CA1 que disparan en ráfaga varía en las primeras semanas de vida postnatal. De modo que ninguna neurona dispara en ráfaga antes del octavo día postnatal, en los siguientes días aparece este patrón, incrementándose hasta alcanzar un máximo en torno al P18-19, donde el 74% de las células disparan en ráfaga (Chen et al. 2005). En este período se ha demostrado que la implicación de las corrientes de calcio tipo R y tipo T son fundamentales para la generación de la ADP y el disparo en ráfagas (Chen et al. 2005; Metz et al. 2005; Sánchez-Alonso et al. 2010). A partir de P20 comienza a disminuir el porcentaje de neuronas con patrón de disparo en ráfagas, hasta predominar un patrón de disparo regular en las neuronas piramidales adultas (Chen et al. 2005). Estos cambios en el modo de disparo son esenciales para una correcta

maduración del sistema nervioso. Chen y colaboradores relacionan este período transitorio de disparo con el refinamiento de las conexiones sinápticas en el desarrollo de las neuronas hipocámpales (Chen et al. 2005). De hecho, este período coincide con una intensa proliferación y ramificación de las dendritas apicales y la formación de sinapsis excitatorias en las mismas (Pokorny & Yamamoto 1981a; Pokorny & Yamamoto 1981b; Hsia et al. 1998; Groc et al. 2003). Por último, los resultados de van Elburg y van Ooyen sugieren una relación entre la morfología de las células y el disparo en ráfaga. Así, alteraciones en el tamaño o la morfología de las células piramidales, como las observadas en el Alzheimer, la epilepsia o el estrés crónico, podrían cambiar el patrón de disparo de las neuronas, afectando en último término al procesamiento de la información y a los procesos cognitivos (van Elburg & van Ooyen 2010).

5. Plasticidad de la excitabilidad intrínseca.

5.1. Consideraciones generales.

Variaciones fisiológicas y patológicas en la actividad neuronal pueden inducir cambios en la expresión y/o en las propiedades biofísicas de los canales iónicos expresados en las membranas dendríticas y axosomáticas, y por lo tanto modificar sus propiedades intrínsecas (Remy et al. 2010). Por ello, en las últimas décadas se ha mostrado un gran interés en estudiar los cambios dependientes de actividad que se producen en los circuitos neuronales. Dichos cambios pueden estar relacionados con cambios en la eficacia de las conexiones sinápticas excitatorias o inhibitorias entre las neuronas. Pero además, pueden ser debidos a fenómenos que alteran el acoplamiento entre los potenciales postsinápticos y el PA (Beck & Yaari 2008; Watt & Desai 2010).

La plasticidad sináptica afecta a la relación entrada-salida de la información de las neuronas, interviene en el almacenamiento de dicha información, está relacionada con los cambios del comportamiento y juega un papel importante en los procesos de memoria y aprendizaje. Los mecanismos moleculares responsables de la expresión de las distintas formas de plasticidad sináptica han sido estudiados intensamente a lo largo de los últimos años y se pueden localizar tanto a nivel presináptico (1a en la Figura I7), como postsináptico (1b en la Figura I7) (Lynch et al. 1983; Malenka et al. 1988; Dudek & Bear 1992; Malinow & Malenka 2002; Zucker & Regehr 2002; Neher & Sakaba 2008; Kessels & Malinow 2009).

Sin embargo, además de estas plasticidades, algunos autores postulan la existencia de una plasticidad neuronal intrínseca (2 en la Figura 17), la cual provocaría modificaciones dependientes de actividad en la regulación del mensaje neuronal, mediante cambios en las propiedades funcionales intrínsecas de estructuras no-sinápticas, sin alterar la transmisión sináptica (Beck & Yaari 2008; Nelson & Turrigiano 2008; Watt & Desai 2010). La plasticidad intrínseca se podría definir como una modulación del estado funcional o del nivel de expresión de los canales iónicos presentes en la membrana neuronal, y que conlleva cambios en las excitabilidad de la membrana (Frick & Johnston 2005). La localización celular de estos cambios va a determinar su efecto en la computación neuronal. Por ejemplo, un cambio en la excitabilidad en una región próxima al cono axónico modificaría la eficacia de generación de un PA por parte de todas las entradas sinápticas. Por otra parte, una plasticidad intrínseca generada en una rama dendrítica sólo alteraría la integración local y la eficacia de algunas entradas sinápticas (Frick & Johnston 2005). Además de estas consideraciones espaciales, el tiempo también es un factor crucial que determina el impacto de la plasticidad intrínseca en la función neuronal. La plasticidad intrínseca modula la excitabilidad de neuronas o redes neuronales de una forma transitoria o permanente, y de este modo contribuye a la formación de memoria a corto o largo plazo, o a la aparición de patologías como la epilepsia (Frick & Johnston 2005; Watt & Desai 2010).

Los primeros estudios sobre la plasticidad intrínseca se realizaron en preparaciones de invertebrados, donde se observó que la actividad puede cambiar una neurona de tónica a fásica mediante una regulación del balance de corrientes de entrada y salida (Turrigiano et al. 1994; Turrigiano 1995). A partir de entonces se han descrito distintas formas de plasticidad intrínseca en numerosas regiones del cerebro, tanto *in vivo* como *in vitro*, entre las que merecen destacarse el hipocampo, el cerebelo y la neocorteza (Aizenman & Linden 2000; Daoudal & Debanne 2003; Zhang & Linden 2003; Fan et al. 2005; Nelson & Turrigiano 2008; Grubb & Burrone 2010; O'Leary et al. 2010; Tong et al. 2010; Steinert et al. 2011; Amendola et al. 2012; Ransdell et al. 2012; Kosenko & Hoshi 2013; Martinello et al. 2015; Valero-Aracama et al. 2015).

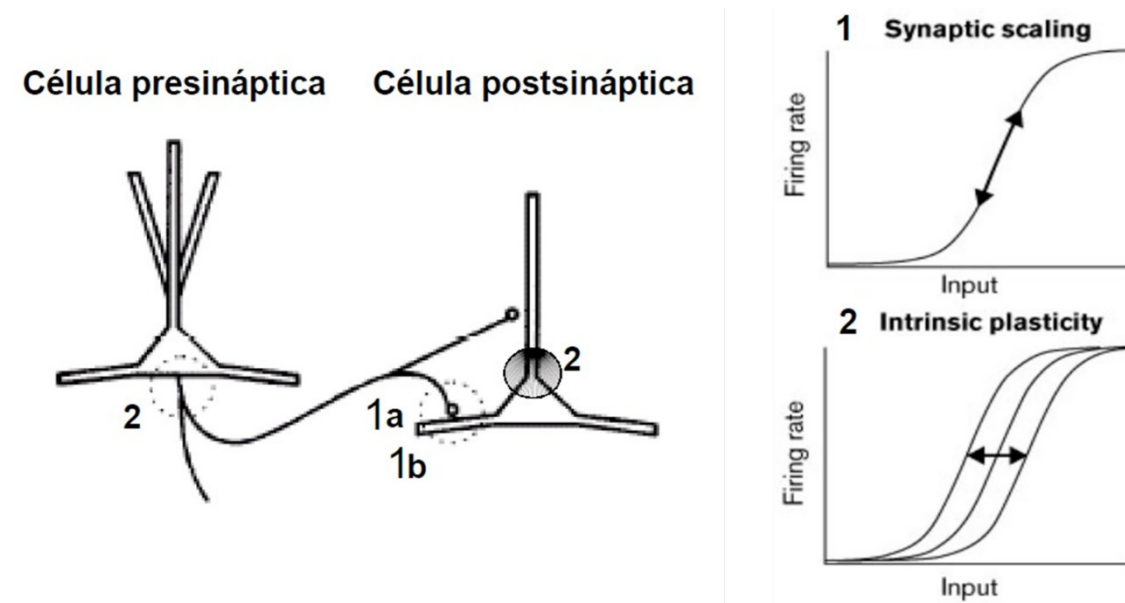


Figura 17. Plasticidad sináptica frente a plasticidad no-sináptica.

Las formas de plasticidad sináptica y no sináptica controlan de un modo distinto la relación entrada-salida de la neurona.

La plasticidad sináptica modifica la eficacia sináptica a nivel presináptico (1a) o postsináptico (1b). Una neurona dispara más o menos PAs dependiendo del conjunto de entradas sinápticas excitatorias e inhibitorias que recibe en un momento dado. Así la relación entrada-salida de la neurona varía de arriba a abajo durante la plasticidad sináptica.

Por el contrario la plasticidad intrínseca (2) produce cambios en las propiedades funcionales de las estructuras no-sinápticas tanto en la neurona presináptica, como en la postsináptica. La regulación de la plasticidad intrínseca modifica la curva entrada-salida hacia la izquierda o hacia la derecha. Es decir, la neurona dispara más o menos PAs para las mismas conexiones sinápticas. Además la plasticidad intrínseca puede modificar la pendiente de la curva.

Figuras extraídas de las revisiones publicadas por Turrigiano y Nelson (2000) y por Debanne y colaboradores (2003).

5.2. Modificaciones producidas en la relación entrada-salida.

El estudio de los cambios en la excitabilidad neuronal es un tema crítico en el análisis de los mecanismos del aprendizaje y la memoria (Mozzachiodi & Byrne 2010). Fisiológicamente, una neurona recibe una serie de aferencias excitadoras e inhibitoras, las procesa en función de su excitabilidad intrínseca y genera una salida en forma de PAs. Para estudiar experimentalmente la excitabilidad neuronal se suelen construir gráficas que relacionan la entrada y la salida. Estas gráficas se determinan aplicando estímulos despolarizantes de intensidad creciente y contando el número de PAs generados para cada intensidad (Mozzachiodi & Byrne 2010). Estos experimentos

no reflejan la situación fisiológica de las neuronas, cuya principal fuente de despolarización procede de los PEPS, pero permite evaluar de una forma bastante aproximada la respuesta de las neuronas frente a diferentes estímulos. Las curvas de entrada-salida construidas con los datos de intensidad de corriente y número de PAs disparados para cada intensidad, se caracterizan por tres parámetros que aportan la siguiente información (Mozzachiodi & Byrne 2010) (Figura I8):

- Intensidad de estímulo umbral: es la mínima cantidad de corriente o voltaje requerida para generar al menos un PA.
- Pendiente de la curva: informa de la velocidad de cambio en la frecuencia de disparo al variar la intensidad de la entrada.
- Valor máximo de la salida: puede ser el número de PAs generados o la frecuencia de disparo máxima.

Los cambios en la excitabilidad de una neurona producidos por la actividad neuronal o el aprendizaje pueden provocar cambios en la intensidad de estímulo umbral (Figura I8, verde oscuro), en la pendiente de la curva de entrada-salida (Figura I8, negro), en la frecuencia máxima de disparo (Figura I8 naranja) o en cualquier combinación de los tres parámetros (Figura I8, azul).

Las relaciones de entrada-salida pueden depender de la duración del estímulo usado para generarla, por la activación e inactivación de corrientes iónicas dependientes de tiempo que subyacen a la excitabilidad neuronal. Por lo tanto, un cambio en la excitabilidad observado con una determinada duración del estímulo podría no apreciarse con una duración diferente (Mozzachiodi & Byrne 2010). Por último conviene destacar que debido a la compleja geometría de las neuronas y a la distribución diferencial de los canales iónicos en los distintos compartimentos y subcompartimentos neuronales, cualquier neurona puede tener multitud de curvas de entrada-salida locales, pudiendo ser modulada cada una de ellas independientemente (Mozzachiodi & Byrne 2010).

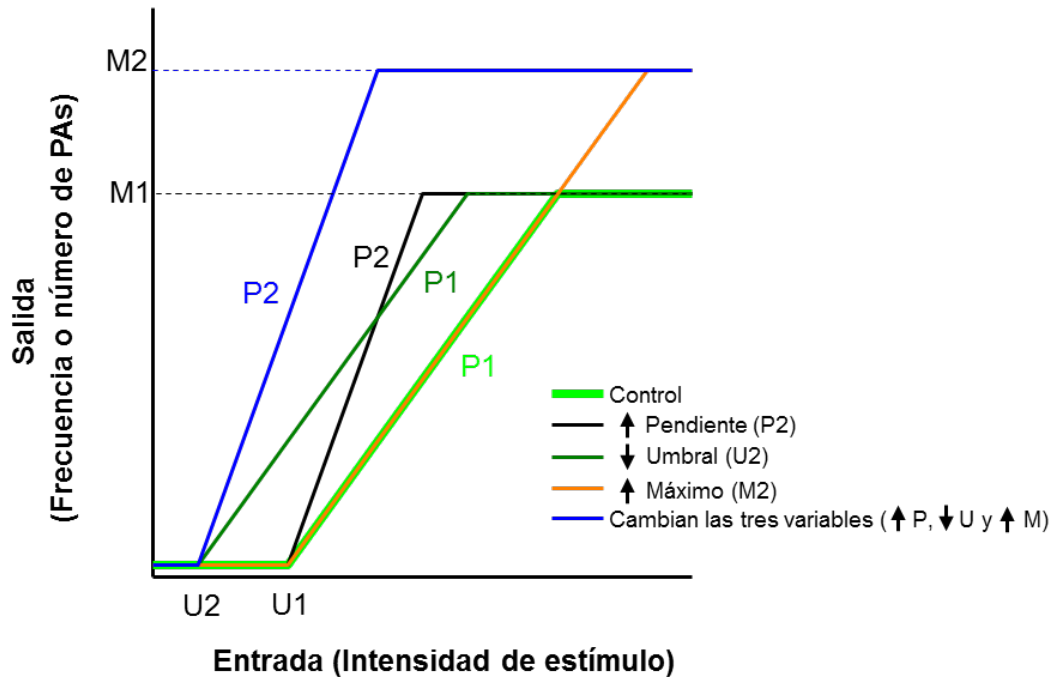


Figura I8. Representación de la excitabilidad neuronal mediante curvas de entrada-salida.

Esquema publicado por Mozzachiodi y Byrne (2010) que muestra la representación de curvas de entrada-salida como herramienta de estudio de la excitabilidad neuronal. En ellas se representa la señal de salida generada (frecuencia o número de PAs) frente la señal de entrada aplicada (la intensidad del estímulo). Según la excitabilidad intrínseca de la neurona, se obtiene una curva de entrada-salida que se caracteriza por la intensidad umbral necesaria para generar una señal de salida (Umbral, U), la frecuencia máxima de PAs (Máximo, M) y la pendiente de la curva (Pendiente, P). Cambios en la excitabilidad de la neurona provocan cambios en las curvas. Así, partiendo de una neurona con una curva de entrada-salida cuyos parámetros son P1, U1, y M1 (control, trazo verde claro):

- Puede cambiar únicamente la pendiente de la curva. En el trazo negro aumenta la pendiente (P2).
- Puede cambiar únicamente el umbral de la curva. En el trazo verde oscuro se desplaza el umbral hacia la izquierda (U2).
- Puede cambiar únicamente el valor máximo de la señal de salida. En el trazo naranja aumenta la señal de salida (M2).
- Pueden cambiar varias variables simultáneamente. En el trazo azul: la pendiente y el valor máximo de la señal de salida aumentan (P2 y M2) y el umbral se desplaza hacia la izquierda (U2).

5.3. Plasticidad intrínseca en función de su localización.

La mayor parte de las distintas formas de plasticidad intrínseca dependen de cambios en la densidad de los canales iónicos dependientes de voltaje, o en sus propiedades funcionales. Como en una neurona los canales no se distribuyen de forma homogénea por su superficie, los mecanismos de plasticidad intrínseca son diferentes entre dendritas, somas y axones neuronales (Beck & Yaari 2008).

5.3.1. Plasticidad intrínseca en las dendritas.

Los canales iónicos de las dendritas regulan la excitabilidad de las mismas y la integración de las señales de varias formas (Häusser et al. 2000), al controlar la eficacia de los potenciales sinápticos. Así, los canales iónicos de las dendritas modifican los potenciales sinápticos que se propagan a lo largo de las mismas, alterando la salida de PAs. Existen varios tipos:

- Canales de calcio que incrementan la despolarización de los PEPS y activan las cascadas de señalización intracelular. En las dendritas distales hay abundancia de canales implicados en las corrientes tipo R y tipo T, mientras que los implicados en las corrientes tipo L y tipo N son más abundantes en las regiones dendríticas proximales (Beck & Yaari 2008; Remy et al. 2010).
- Hay una expresión abundante de canales Kv4.2 implicados en la corriente tipo A de potasio, con un papel atenuador que contribuye a frenar la propagación de los PEPS (Beck & Yaari 2008; Remy et al. 2010; Trimmer 2015). Estos canales asimismo filtran los PAs retropropagados. Dicha modulación es importante en la generación de la plasticidad dependiente del acoplamiento entre el PA retropropagado y el PEPS (STDP, *spike-timing dependent plasticity*) (Beck & Yaari 2008; Remy et al. 2010).
- En dendritas apicales se expresan los canales HCN implicados en la corriente tipo H, una corriente catiónica parcialmente activada a potencial de reposo. Durante un PEPS se produce una desactivación de la corriente tipo H, reduciendo la duración del PEPS, mientras que durante un PIPS esta corriente se activa, reduciendo la duración del PIPS, por lo que afecta a la sumación temporal de señales sinápticas (Beck & Yaari 2008; Remy et al. 2010).
- Por último, en las dendritas apicales de las neuronas piramidales se ha encontrado una densidad de canales de sodio dependientes de voltaje más o

menos suficiente como para generar PAs dendríticos que pueden servir como una señal local para generar plasticidades sinápticas en la dendrita, o propagarse al soma con la suficiente amplitud como para provocar PAs en el propio soma (Golding & Spruston 1998; Beck & Yaari 2008).

Tras la administración de protocolos de estimulación generalmente usados para inducir potenciación a largo plazo (LTP, *long-term potentiation*), se ha observado un desplazamiento hacia la izquierda de la curva de inactivación de la corriente tipo A que favorece la propagación de los PEPS hacia el soma y de los PAs retropropagados hacia las dendritas (Frick et al. 2004; Gasparini et al. 2007) debido a una fosforilación de los canales Kv4.2 (Hoffman & Johnston 1998). Además, la inducción de LTP produce una invaginación de canales Kv4.2 (Kim et al. 2007; Jung & Hoffman 2009). Hammond y colaboradores demostraron que la internalización de los canales Kv4.2 dependientes de actividad está mediada por fosforilación a través de la proteína quinasa A (Hammond et al. 2008). Además, se ha observado una disminución similar en la expresión de los canales Kv4.2 en modelos de epilepsia crónica inducidos con pilocarpina, debido a un incremento en la fosforilación de los canales Kv4.2 (Bernard et al. 2004). Monaghan y colaboradores observaron una reducción de la proteína de interacción con los canales Kv4 tipo 2 (KChIP2), una proteína de interacción que modula la cinética de inactivación de la corriente tipo A (Monaghan et al. 2008).

Hyun y colaboradores observaron un aumento de la excitabilidad de las neuronas piramidales de CA3 tras estimular a alta frecuencia las fibras musgosas, debido a una disminución en la expresión de los canales Kv1.2 en sus dendritas apicales distales (Hyun et al. 2013; Hyun et al. 2015). La disminución de la corriente tipo D debido a la menor expresión de los canales Kv1.2 facilita la activación de los canales de sodio dendríticos.

También se han mostrado plasticidades intrínsecas mediadas por cambios en la corriente tipo H. De modo similar a la corrientes tipo A y tipo D, la inducción de LTP produce una disminución de corriente tipo H que causa un aumento de la sumación de PEPS y cambia las propiedades oscilatorias subumbrales mediadas por la corriente tipo H en dendritas (Wang et al. 2003; Fan et al. 2005; Narayanan & Johnston 2007). En cambio, la depleción de calcio de los depósitos intracelulares produce un incremento de la densidad de canales HCN en neuronas piramidales (Narayanan et al. 2010). Modelos de epilepsia crónica inducidos por pilocarpina también producen una disminución de la corriente tipo H (Jung et al. 2007).

5.3.2. Plasticidad intrínseca en el soma y el axón.

Tras propagarse hacia el soma, se produce una sumación de los potenciales sinápticos que causa un cambio de voltaje en el soma. Si este cambio de voltaje es superior al umbral de disparo, se generará un PA en el cono axónico (Beck & Yaari 2008).

Plasticidad intrínseca en el umbral de disparo.

La función integradora de una neurona dentro de un circuito está fuertemente afectada por el umbral del voltaje necesario para generar un PA. Este umbral puede verse modificado por la actividad previa de la neurona. Así, se ha observado que el umbral de disparo se hiperpolariza tras la inducción de una LTP (Aizenman y Linden, 2000; Cudmore y Turrigiano, 2004; Xu et al., 2005; Grubb y Burrone, 2010). Este efecto probablemente se debe a cambios en las propiedades dependientes de voltaje del canal de sodio (Xu et al., 2005). Sin embargo, Muñoz-Cuevas y colaboradores (2004) observaron una despolarización del umbral de disparo tras aplicar un tétanos de 10 Hz.

Por otra parte Kim y colaboradores (2005) observaron que una sobreexpresión de los canales Kv4.2 provocaba una despolarización del umbral de disparo. Además, Cudmore y colaboradores (2010) observaron el control que ejerce la corriente de potasio tipo D sobre la precisión del disparo de PAs, pues al bloquear esta corriente había una mayor variabilidad de latencias de disparo, junto a una mayor variabilidad en el umbral de disparo. Hyun y colaboradores observaron una disminución en la expresión de la subunidad Kv1.2 tras una tetanización de 10 Hz. Asimismo, disminuye la latencia del disparo de PAs y aumenta el número de PAs (Hyun et al. 2013; Hyun et al. 2015). Otros estudios también demostraron una despolarización del umbral de disparo en respuesta a una despolarización sostenida durante varios días como consecuencia del incremento de corrientes de potasio (O'Leary et al. 2010; Tong et al. 2010).

En modelos de dolor inflamatorio crónico se ha visto una hiperpolarización del umbral de neuronas del ganglio de la raíz dorsal debido a un gran incremento de las corrientes de sodio, junto a una disminución de la corriente tipo A (de nuevo por invaginación de los canales Kv4.2 fosforilados) (Beck & Yaari 2008). En otros modelos de dolor crónico, se ha observado un incremento de la excitabilidad de las neuronas del ganglio de la raíz dorsal debido a un incremento de la corriente de calcio tipo T por una sobreexpresión del canal Cav3.2. Probablemente esta hiperexcitabilidad en las neuronas de la vía del dolor esté relacionada con la

hiperalgesia y la alodinia observadas en los modelos animales de dolor crónico (Beck & Yaari 2008).

Plasticidad intrínseca en el patrón de disparo.

Como ya se mencionó, las neuronas pueden disparar con un patrón de disparo regular o un patrón de disparo en ráfagas. Las propiedades del patrón de disparo pueden presentar cambios dependientes de actividad. Así, Brown y Randall observaron una depresión a largo plazo de la ADP y un cambio a un patrón de disparo regular en neuronas piramidales de CA3 tras despolarizar sostenidamente la membrana durante 150 s a -14 mV, debido a un incremento de los canales Kv7 implicados en la corriente de potasio tipo M (Brown & Randall 2009). Por otra parte, Graves y colaboradores describieron un incremento del patrón de disparo en ráfagas de las neuronas piramidales de CA1 y de subículo tras un protocolo de LTP consistente en 5 estímulos sinápticos a 100 Hz, repetidos a 5 Hz durante 3 segundos, pareados con inyección intrasomática de corriente en ese intervalo (Graves et al. 2012). Además, demostraron que esta plasticidad estaba mediada por receptores metabotrópicos de glutamato.

La conversión de un patrón de disparo regular a un disparo en ráfagas también parece ser una característica de varios modelos de desórdenes neurológicos en los que hay cambios en la actividad neuronal. Por ejemplo, en modelos de epilepsia se ha descrito la conversión del patrón de disparo de regular a en ráfagas en neuronas piramidales de CA1 y subículo (Baraban & Schwartzkroin 1995; Sanabria et al. 2001; Wellmer et al. 2002). También se han observado cambios en modelos de estrés. La exposición a un agonista de los receptores de mineralocorticoides durante dos semanas incrementa el porcentaje de neuronas piramidales de CA3 con disparo en ráfagas. Además, en modelos de dolor crónico, se observó un cambio en el patrón de disparo de las neuronas del ganglio de la raíz dorsal y en neuronas del tálamo, asociado al incremento de las corrientes de sodio y de la de calcio tipo T, y a la disminución de la corriente de potasio tipo A (Beck & Yaari 2008).

Plasticidad intrínseca en el disparo repetitivo.

Además de sobre el umbral y el patrón de disparo, se pueden producir cambios dependientes de la actividad en el disparo repetitivo de las neuronas (Beck & Yaari 2008). En este caso, la salida de PAs se ve afectada por una serie de conductancias que se reclutan durante el disparo repetitivo. Entre ellas se incluyen corrientes de potasio que hiperpolarizan y reducen el

disparo de los PAs (Beck & Yaari 2008). Se han descrito varios tipos de plasticidades intrínsecas en el disparo repetitivo:

- En 1996, Disterhoft y colaboradores observaron que tras el período de condicionamiento en varias tareas de aprendizaje se producía una disminución de la hiperpolarización post-potencial de acción (AHP, *after-hyperpolarization potential*) y de la acomodación en las neuronas piramidales del hipocampo que está relacionado con el aprendizaje. La disminución de la AHP en diversas tareas de aprendizaje, podría deberse a una regulación de la corriente a través de la actividad sináptica de los receptores metabotrópicos (Beck & Yaari 2008).
- Fan y colaboradores demostraron en neuronas piramidales de CA1 que un incremento de actividad, bien producido al administrar un protocolo de LTP o por un incremento de la concentración extracelular de potasio, producía una disminución de la excitabilidad neuronal reflejada en un desplazamiento hacia la derecha de curva de entrada-salida, así como una disminución de su pendiente, debido a un incremento de la corriente tipo H por un aumento en la expresión de los canales HCN (Fan et al. 2005).
- En 2009, Caspi y colaboradores demostraron que en una situación de hipoosmolaridad se producía un aumento de la excitabilidad debido a una inhibición por calcio de los canales Kv7 implicados en la corriente tipo M.
- O'Leary y colaboradores observaron también un desplazamiento hacia la derecha de la curva de entrada-salida tras despolarizar la membrana durante varios días mediante la incubación en una solución extracelular con elevada concentración de potasio de cultivos primarios de hipocampo (O'Leary et al. 2010). Esta disminución de la excitabilidad es debida al incremento de la corriente de potasio de fuga. En el mismo año, Tong y colaboradores encontraron resultados similares en neuronas del núcleo medial del cuerpo trapezoide, que correlacionaron con un aumento en la expresión de ARNm de los canales de potasio Kv1.1 y Kv3.3 (Tong et al. 2010).
- En 2013, Kosenko y Hoshi demostraron que la modulación que ejerce el calcio sobre los canales Kv7 se debe a la formación de complejos Kv7-calmodulina.
- La despolarización de las células de Purkinje por inyección intrasomática o por estimulación de las fibras paralelas produce un aumento de la excitabilidad intrínseca a largo plazo al disminuir la corriente SK (Ohtsuki et al. 2012).

- En respuesta a un aumento de actividad del circuito, como sucede durante la fase de condicionamiento en una prueba de parpadeo, se observó un aumento de la excitabilidad intrínseca de las neuronas piramidales de CA1 y de las interneuronas debido a una disminución en la expresión de los canales SK (McKay et al. 2013).

Estos mecanismos de disminución de la AHP pueden ser relevantes para la evolución de las crisis epilépticas (Martin et al. 2001). Así, la disminución en la expresión o la pérdida de función de los canales Kv7 producen la aparición de crisis epilépticas (Qiu et al. 2007).

5.4. Plasticidad homeostática.

A lo largo de los últimos veinte años se han descrito mecanismos de plasticidad “homeostática” que permiten estabilizar las neuronas y la función de los circuitos. Esta forma de plasticidad estabiliza la actividad neuronal en respuesta a las perturbaciones externas mediante cambios en el número o eficacia de las sinapsis o mediante cambios de la excitabilidad intrínseca (Desai 2003; Beck & Yaari 2008; Nelson & Turrigiano 2008; Watt & Desai 2010). Los estudios sobre las plasticidades homeostáticas muestran que la actividad neuronal está sujeta a un control de retroalimentación negativa. Así, algunas plasticidades homeostáticas descritas son las siguientes:

- El bloqueo crónico de la actividad de las neuronas piramidales de corteza visual en cultivo mediante la aplicación de tetrodotoxina, produce un incremento de la amplitud de las corrientes postsinápticas excitadoras en miniatura, mientras que el incremento crónico de la actividad mediante el bloqueo de los receptores GABA produce una disminución de la amplitud de las corrientes postsinápticas excitadoras en miniatura (Turrigiano et al. 1998).
- El bloqueo de la actividad durante 48 horas de las neuronas piramidales de corteza produce un incremento de la excitabilidad neuronal debido a una disminución de las corrientes de potasio sensibles al bloqueante tetraetilamonio (Desai et al. 1999).
- La generación de un tren de PAs durante varios segundos en las neuronas piramidales de CA1 provoca una mayor acomodación debido a un incremento de los canales implicados en la corriente tipo M (Wu et al. 2008).

- La estimulación sináptica de alta frecuencia disminuye la excitabilidad de las neuronas principales del núcleo medial del cuerpo trapezoide y de las neuronas piramidales de CA3 por un incremento de la expresión de los canales Kv2 que es dependiente de óxido nítrico (Steinert et al. 2011).
- Ransdell y colaboradores observaron una relación inversa entre la amplitud de la corriente tipo A y la amplitud de la corriente de potasio dependiente de calcio en neuronas del ganglio cardiaco del cangrejo, con el fin de estabilizar la función neuronal (Ransdell et al. 2012).

Algunas de las plasticidades descritas en secciones anteriores también son plasticidades homeostáticas. Así, Fan y colaboradores observaron que un incremento de actividad, bien producido al administrar un protocolo de LTP o por un incremento de la concentración extracelular de potasio, produce una disminución de la excitabilidad en las neuronas piramidales de CA1 debido a un incremento de la corriente tipo H (Fan et al. 2005). También se ha observado en neuronas piramidales del hipocampo y en las del núcleo medial del cuerpo trapezoide que despolarizaciones sostenidas durante varios días producen el aumento de algunas corrientes de potasio (O'Leary et al. 2010; Tong et al. 2010). Además, la despolarización sostenida durante 150 s a -14 mV produce una disminución del disparo en ráfagas en las neuronas piramidales de CA3 debido a un incremento de la corriente tipo M de potasio (Brown & Randall 2009).

5.5. Cambios dependientes de actividad en la morfología del potencial de acción.

Algunas de las corrientes dependientes de actividad que se mencionaron previamente en el Apartado 5.3 participan en la generación del PA. Así, se han observado aumentos de las corrientes de sodio y/o una disminución de la corriente tipo A de potasio que hiperpolarizan el umbral de disparo tras aplicar protocolos de LTP (Aizenman & Linden 2000; Cudmore & Turrigiano 2004; Xu et al. 2005; Grubb & Burrone 2010) y en ciertas patologías que producen hiperexcitabilidad neuronal (Beck & Yaari 2008). El efecto contrario se produce estimulando con protocolos que provocan depresión sináptica, los cuales despolarizan el umbral de disparo (Muñoz-Cuevas et al. 2004). Sin embargo, una despolarización sostenida durante varios días

produce un cambio homeostático que despolariza el umbral debido a un incremento de corrientes de potasio (O'Leary et al. 2010; Tong et al. 2010).

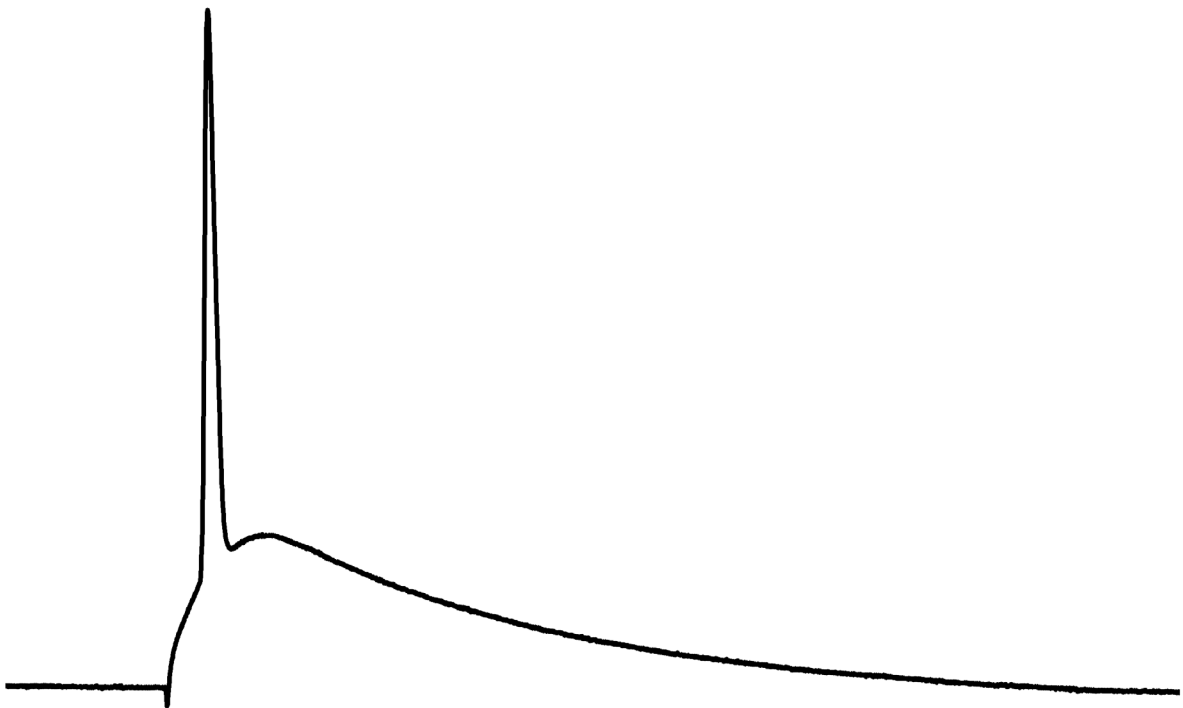
Otro cambio dependiente de actividad muy estudiado en la morfología del PA es el aumento de la duración que se produce durante un disparo repetitivo de alta frecuencia (Aldrich et al. 1979; Ma & Koester 1996; Giese et al. 1998; Shao et al. 1999; Kim et al. 2005; Gu et al. 2007; Gittis et al. 2010; Kim 2014). Este incremento en la duración es un fenómeno complejo, pues se produce por una inactivación de las corrientes de potasio que participan en la repolarización del PA en condiciones normales, sobre todo por la inactivación de la corriente tipo A (Ma & Koester 1996; Kim et al. 2005; Gu et al. 2007). Sin embargo, hay varias corrientes de potasio que en condiciones normales no tienen una participación muy importante en la repolarización del PA, pero que aumenta considerablemente su participación durante el disparo repetitivo y sustituyen a las corrientes que se han inactivado, limitando la magnitud del incremento en la duración. Estas son corrientes rectificadoras retardadas cuyas cinéticas de activación son demasiado lentas como para contribuir en la repolarización de un único potencial de acción, y las corrientes de potasio dependientes de calcio (siendo la tipo BK la más implicada en la repolarización del PA), activadas por el calcio que entra durante cada potencial de acción (Ma & Koester 1996; Giese et al. 1998; Shao et al. 1999; Bean 2007; Gu et al. 2007; Gittis et al. 2010; Liu & Bean 2014). Funcionalmente, este aumento de la duración de los PAs provocaría un aumento en la liberación de neurotransmisor de un modo diferencial en función de la magnitud de los incrementos en la duración de los PAs (Andrew & Dudek 1985; Fagan & Andrew 1991; Qian & Saggau 1999; Geiger & Jonas 2000).

Muñoz-Cuevas y colaboradores también observaron un aumento de la duración del PA tras aplicar una tetanización a 10 Hz (Muñoz-Cuevas et al. 2004). Por otra parte, se ha demostrado que varias corrientes pueden ser bloqueadas o potenciadas a través de la activación de distintas cascadas de segundos mensajeros (Castellucci et al. 1982; Collin et al. 1990; Roeper et al. 1997; Hoffman & Johnston 1998; Wu & Barish 1999; Jung & Hoffman 2009; Lin et al. 2011; He et al. 2014), por lo que la activación sináptica de los receptores acoplados a estos sistemas de señalización celular podrían alterar la duración de los PAs y afectar a la liberación posterior del neurotransmisor.

Además de todos estos procesos relacionados con el incremento de la duración de los PAs, también se han observado cambios dependientes de actividad dirigidos a disminuir la duración del PA. Un ejemplo de este hecho se ha hallado en motoneuronas de langostas, las cuales, ante patrones de descarga fisiológicos, presentan una disminución progresiva de la duración de los PAs, contribuyendo a la depresión a corto plazo de la respuesta de la neurona

diana de estas motoneuronas (Niven & Burrows 2003). Por otra parte, Jackson y Bean (2007) observaron un aumento de la corriente tipo A activada mediante rampas despolarizantes tras aplicar el bloqueante de la corriente tipo A, 4-aminopiridina, en neuronas del núcleo tuberomamilar.

OBJETIVOS



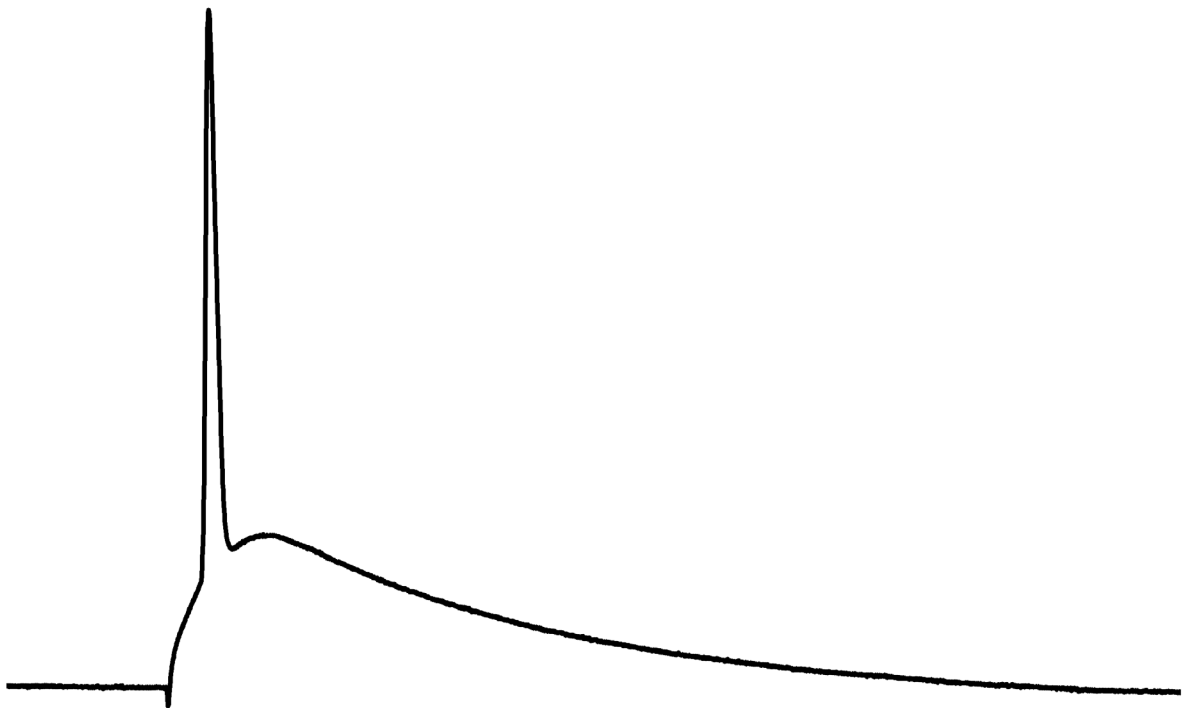
En las últimas décadas se han realizado numerosos estudios sobre las características electrofisiológicas básicas de las neuronas piramidales del área CA1, así como de su conectividad dentro del circuito trisináptico del hipocampo. También se han estudiado exhaustivamente los cambios plásticos en la eficacia sináptica de la sinapsis CA3-CA1 en función de la actividad previa. Sin embargo, no se ha abordado en profundidad la influencia de la excitabilidad neuronal sobre el desarrollo postnatal. Asimismo, apenas se ha profundizado en las plasticidades intrínsecas que se producen durante el desarrollo en respuesta a variaciones fisiológicas y patológicas en la actividad neuronal. Con el objetivo global de estudiar la excitabilidad de las neuronas piramidales de CA1 y su plasticidad durante el desarrollo, se planteó una serie de objetivos más concretos:

1. Estudiar la evolución de las características electrofisiológicas durante el período comprendido entre los 9 y los 19 días de edad postnatal.
 - Caracterizar la evolución de las propiedades pasivas de la membrana.
 - Caracterizar los cambios en la morfología del potencial de acción a baja frecuencia de disparo, así como las modificaciones que se producen en éste durante un disparo de alta frecuencia.
 - Investigar cómo repercuten los cambios producidos en los puntos anteriores sobre la excitabilidad neuronal.
2. Estudiar la importancia del potencial de la membrana sobre la excitabilidad neuronal y la plasticidad intrínseca durante el período comprendido entre los 9 y los 19 días de edad postnatal.
 - Analizar el efecto de una despolarización subumbral breve (1 s) sobre la morfología del potencial de acción.
 - Analizar el efecto de una despolarización subumbral sostenida (5 min) sobre la morfología del potencial de acción.
 - Estudiar y caracterizar la generación de posibles plasticidades intrínsecas al despolarizar sostenidamente el potencial de la membrana mediante el análisis de: tiempos de inducción y extinción, efecto sobre la excitabilidad neuronal y mecanismos de inducción y de expresión de la plasticidad.
3. Estudiar el papel del calcio extracelular sobre la excitabilidad neuronal.
 - Implicaciones sobre las propiedades pasivas de la membrana.

OBJETIVOS

- Implicaciones sobre la morfología del potencial de acción y de la despolarización post-potencial.
- Implicaciones sobre el patrón de disparo y la frecuencia de disparo.

MATERIAL Y MÉTODOS



1. Animales de experimentación.

Los experimentos se realizaron con ratas de raza Wistar de ambos sexos criadas en el animalario de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid. Se consideró como día cero de edad postnatal al día de nacimiento de las crías. En la mayor parte de los experimentos se utilizaron dos rangos de edades: un grupo de 9 a 12 días (P9-12) y otro de 16 a 19 días (P16-19). En algunos experimentos se empleó un tercer grupo con ratas de 30 a 50 días (30-50). Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la normativa española (BOE 1201/2005) y europea (2003/65/CE) para uso y manipulación de animales de laboratorio.

2. Obtención de las rodajas y células disociadas de hipocampo.

Todos los experimentos de electrofisiología se realizaron sobre preparaciones *in vitro* de rodajas de hipocampo. Los animales se sacrificaron por decapitación sin anestesia. Inmediatamente después se procedió a la extracción del cerebro, y las rodajas se obtuvieron mediante los siguientes métodos:

- Apartados 1 y 2 de Resultados: Tras extraer el cerebro, se aislaron los dos hipocampos y se colocaron sobre una lámina de agar situada bajo la cuchilla de un cortador manual. Posteriormente se realizaron cortes transversales de aproximadamente 400 μm de grosor (500 μm para el registro de neuronas disociadas).
- Apartado 3 de Resultados: Tras extraer el cerebro, se realizaron rodajas sagitales de 400 μm de grosor del hipocampo a nivel septal usando un vibratomo Leica VT1200S.

Para mantener el tejido en condiciones óptimas, se aplicó constantemente solución Krebs-Ringer-bicarbonato (KRB) (cuya composición se detalla en la Tabla M1) burbujeada con gas carbógeno (95%O₂, 5%CO₂) a una temperatura inferior a 4°C. Las rodajas obtenidas por ambos métodos se depositaron en una placa Petri llena de KRB frío y oxigenado, e

inmediatamente se transfirieron a una cámara de mantenimiento en interfase a temperatura ambiente (27-29°C).

Los registros en fijación de voltaje se realizaron sobre células disociadas a partir de las rodajas de hipocampo de 500 µm. Las rodajas se sometieron primero a un proceso enzimático y a continuación a otro mecánico, siguiendo el protocolo de Kay & Wong (1986). De cada rodaja de hipocampo se extrajo el área CA1. Seguidamente se dividió en cubos de aproximadamente unos 0,5 mm de lado, los cuales se sumergieron durante 15 minutos a temperatura ambiente (27-30°C) en un baño de incubación en el que se ha añadido la proteasa (Sigma *type XIV*) a una concentración de 2mg/ml en la Solución 2 (Tabla M1). A continuación se lavó la enzima con la Solución 2 sin proteasa. A fin de eliminar por completo la proteasa, se repitió tres veces este proceso de lavado. Posteriormente se realizó el proceso mecánico utilizando pipetas Pasteur de distintos diámetros (diámetros aproximados: 0,1 mm a 0,9 mm). La solución final con las células en suspensión se extendió sobre un cubre de cristal pretratado con poli-L-lisina (para fijar las células recién disociadas) situado sobre el fondo de una placa de Petri.

3. Cámara de mantenimiento.

Tras la obtención de las rodajas existe un período de tiempo en el que no se detecta actividad sináptica en el tejido, presumiblemente debido al trauma que supone la preparación (Selig & Malenka 1997; Kirov et al. 1999). Por ello, todas las rodajas se mantuvieron un mínimo de una hora en la cámara de mantenimiento a temperatura ambiente, tiempo suficiente para permitir la recuperación de su actividad y la estabilización de las células. Esta cámara (Figura M1) consiste en un recipiente cerrado en el que el tejido se conserva en interfase KRB-aire sobre un papel de filtro empapado en solución KRB (Solución 1) contenida en una placa Petri. La atmósfera de la cámara se mantiene oxigenada y saturada en vapor de agua mediante un difusor de gas carbógeno inmerso en el agua con que se llena el fondo de la cámara.

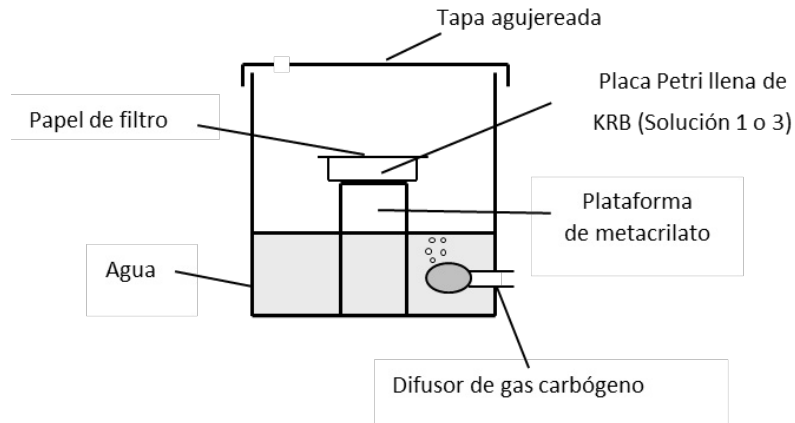


Figura M1: Esquema y fotografía de la cámara de mantenimiento empleada para la incubación de las rodajas de hipocampo.

4. Unidad de registro.

Todos los registros se realizaron sobre una cámara de registro de inmersión situada sobre una mesa antivibratoria en una campana de Faraday.

En los registros en fijación de corriente, se transfirieron las rodajas de hipocampo mediante una pipeta de vidrio a la cámara de registro antes de comenzar cada experimento. La rodaja se mantiene totalmente sumergida en una solución de perfusión oxigenada que se hace circular por un sistema de tubos *Tygon* impermeables al oxígeno a una velocidad constante (entre 1,7 y 2 ml/min) gracias al empleo de una bomba peristáltica (Gilson, Villiers, Francia). Tras bañar la rodaja, la solución de perfusión pasa a un segundo pocillo, de donde es retirada

por aspiración a la misma velocidad mediante una aguja conectada a los tubos de retorno de la bomba.

En los experimentos realizados durante los apartados 1 y 2 de Resultados, se transiluminó el pocillo de registro de la cámara mediante una lámpara de luz fría (a través de fibra óptica) y se visualizó la preparación mediante una lupa binocular para la correcta colocación de los electrodos durante los experimentos (Figura M2, izquierda). Los experimentos se realizaron a una temperatura ambiente de entre 27 y 30°C.

En los experimentos realizados durante el apartado 3 de Resultados, la visualización de la preparación y la colocación de los electrodos se realizó gracias a un microscopio situado sobre la cámara de registro (BX51W, lente de 60x, Olympus) (Figura M2, derecha). Los experimentos se realizaron a una temperatura de entre 31 y 32°C.

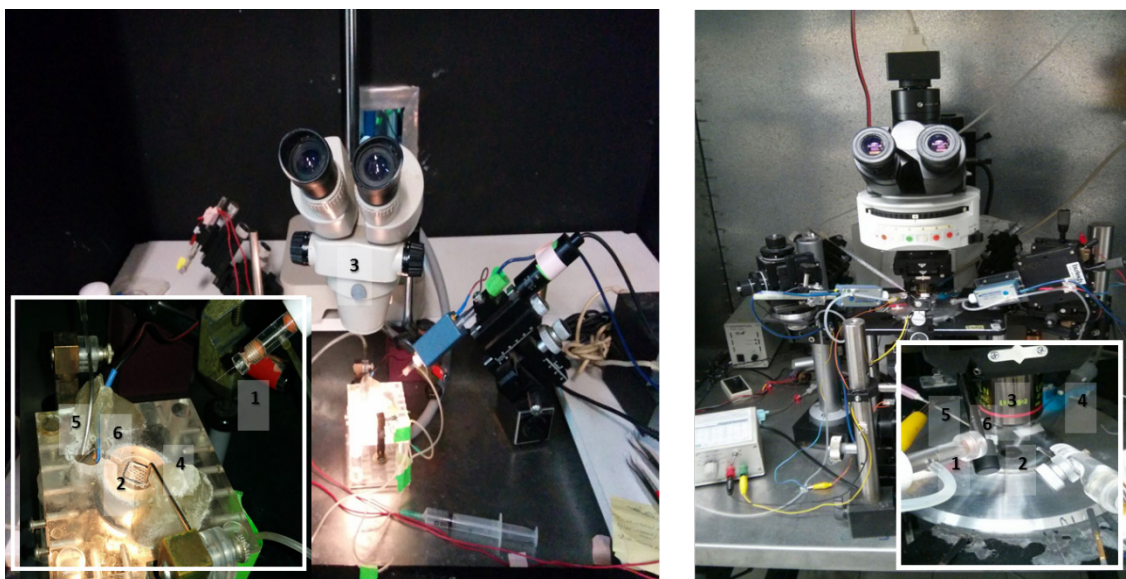


Figura M2. Fotografías de las unidades de registro empleadas para los experimentos realizados en rodajas de hipocampo, con fotos ampliadas de los baños de registro.

- | | |
|-------------------------------|--------------------------------------|
| 1.- Electrodo de registro. | 4.- Entrada de solución extracelular |
| 2.- Baño de registro. | 5.- Salida de solución extracelular. |
| 3.- Objetivo del microscopio. | 6.- Tierra. |

En los registros en fijación de voltaje, se colocó la placa de Petri con las neuronas disociadas en la cámara de registro y se esperó cinco minutos antes de registrar. Se perfundió por gravedad a las células con Solución 3 (Tabla 1) oxigenada, con un flujo constante (1-1,5 ml/min). Se empleó un microscopio (U-TV1X, lente de 40x, Olympus) situado sobre la cámara de registro para visualizar la preparación (Figura M3). Los experimentos se realizaron a una temperatura de entre 27 y 30°C.

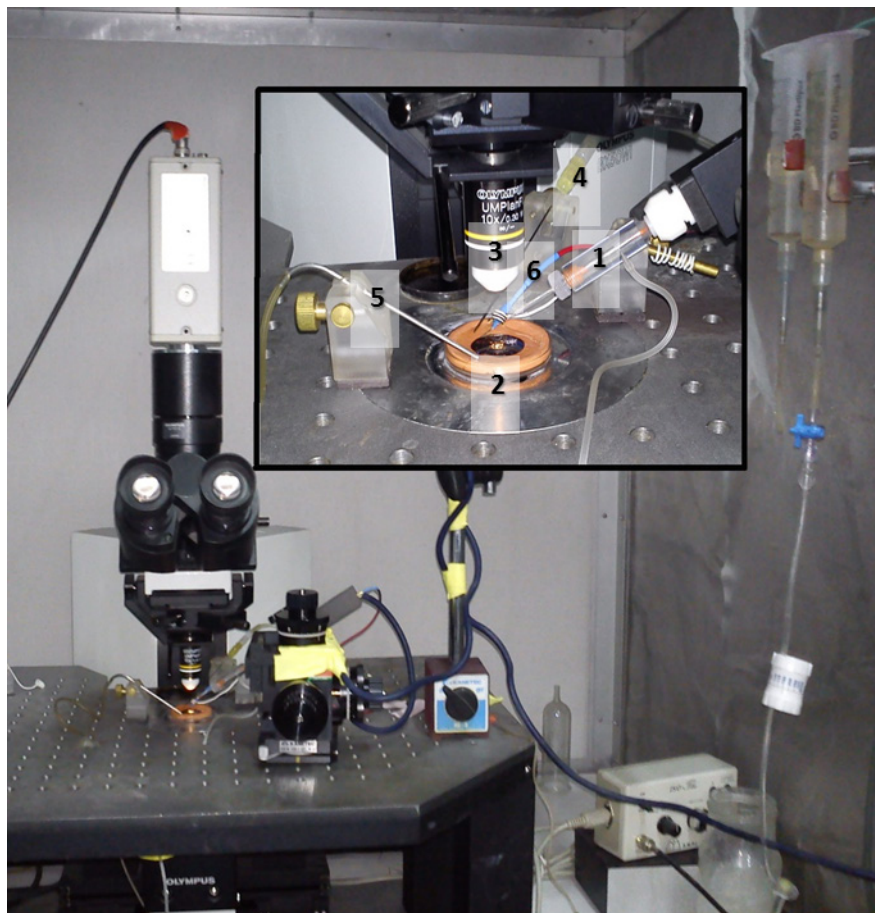


Figura M3. Fotografía de la unidad de registro empleada para los experimentos con células disociadas, con una foto ampliada del baño de registro.

- | | |
|-------------------------------|--------------------------------------|
| 1.- Electrodo de registro. | 4.- Entrada de solución extracelular |
| 2.- Placa de registro. | 5.- Salida de solución extracelular. |
| 3.- Objetivo del microscopio. | 6.- Tierra. |

5. Soluciones empleadas.

Las soluciones extracelulares empleadas para perfundir el tejido durante los experimentos se detallan en la Tabla M1. Todas las soluciones se prepararon diariamente disolviendo los reactivos indicados en agua bidestilada. Durante los experimentos, se burbujearon las soluciones con gas carbógeno con el fin de mantener la correcta oxigenación y un pH en torno a 7,2.

Los experimentos de los apartados 1 y 2 de Resultados se realizaron con las soluciones extracelulares 1 y 3. Los experimentos del apartado 3 de Resultados se realizaron con la solución extracelular 4. En algunos experimentos del apartado 3 de Resultados, se modificó la concentración extracelular de calcio sin modificar la concentración de magnesio. En otros experimentos sí se modificó la concentración de magnesio para mantener equimolar la concentración extracelular de iones divalentes.

Los experimentos de fijación de corriente se realizaron en presencia del antagonista de los receptores de glutamato tipo AMPA, 6-ciano-7-nitro-quinoxalino-2,3-diona (CNQX 10 μM), y del antagonista de los receptores GABA_A, picrotoxina (100 μM), para bloquear los potenciales sinápticos rápidos. En algunos experimentos se añadió también el antagonista de los receptores de glutamato tipo NMDA, D-2-amino-5-fosfonopentanoato (AP5 50 μM).

Los experimentos de fijación de voltaje se realizaron con la solución extracelular 3, en presencia de tetrodotoxina (TTX 0,5 μM), y nifedipina (10 μM) para bloquear los canales de sodio y de calcio de alto umbral respectivamente.

Tabla M1: Soluciones extracelulares.

	Solución 1 Rodaja Apartados 1 y 2	Solución 2 Cel. disociadas (Preparación)	Solución 3 Cel. disociadas (Registro)	Solución 4 Rodaja Apartado 3
NaCl	120	105	105	125
KCl	2,5	5	2,5	4,25
MgCl₂	1,3	1,3	1,3	1,3
CaCl₂	2,5	1	2	3
NaHCO₃	26,2	-	26,2	22
Glucosa	11	25	11	10
HEPES	-	10	-	

Resumen de la composición de las soluciones de perfusión e incubación utilizadas en los experimentos. La concentración de los solutos está expresada en mM. Las soluciones fueron burbujeadas con gas carbónico con el fin de mantener la correcta oxigenación y un pH en torno al 7,2. Todas las soluciones fueron preparadas diariamente con agua bidestilada.

A continuación se detallan los líquidos intracelulares empleados en los experimentos de esta tesis (Tabla M2). Los experimentos de los apartados 1 y 2 de Resultados se realizaron con las soluciones intracelulares A y B, y los experimentos del apartado 3 de Resultados se realizaron con la solución intracelular C. Las soluciones se prepararon disolviendo en agua desionizada Milli-Q los distintos compuestos a excepción del Tris-ATP. Tras el ajuste del pH a 7,2 y la osmolaridad entre 270 y 300 mOsm (ver Tabla 2), se hicieron alícuotas que se congelaron a -20°C hasta el día del experimento. El Tris-ATP se añadió fresco cada día, ya que la descongelación de este compuesto en una solución acuosa altera sus propiedades.

En los experimentos realizados en el apartado 2 de Resultados con distinta concentración de quelantes (BAPTA 10 mM o EGTA 1 mM), no se realizó ninguna modificación adicional en la solución intracelular.

Tabla M2: Soluciones intracelulares.

	Solución A Rodaja Apartados 1 y 2	Solución B Cel. disociadas	Solución C Rodaja Apartado 3
K-Gluconato	125	-	131
Cs-Gluconato	-	-	-
KCl	-	80	6
Sacarosa	-	40	-
EGTA	10	10	1
HEPES	10	10	5
NaCl	8	-	1
Tris-ATP	3	4	3
GTP	0,3	0,3	0,3
MgCl ₂	2	4,5	1
CaCl ₂	0,5	-	-
Fosfocreatina	20	15	-
Creatina fosfoquinasa * (U/ml)	50	-	-
Osmolaridad * (mOsm)	300	275	290-300

Resumen de la composición de las soluciones intracelulares. La concentración de los solutos está expresada en mM (excepto *). El pH se ajustó en torno a 7,2 con KOH.

6. Reactivos y drogas.

Las drogas que se utilizaron en los experimentos se prepararon con antelación como soluciones *stock* concentradas para alterar lo menos posible la composición del líquido extracelular al añadirlas (1000x, excepto la 4-AP que se preparó a 100x). Todas se disolvieron en agua desionizada Milli-Q.

Todos los reactivos y drogas se obtuvieron de Sigma (St. Louis, USA), excepto TTX (Alomone Laboratories), el anticuerpo de ratón anti-KChIP3 (NeuroMab, Davis, CA, USA) o donde se indique en páginas siguientes.

7. Técnicas electrofisiológicas.

Todos los registros de *patch-clamp* de esta tesis se realizaron en modo de célula entera (*whole-cell patch-clamp*). Esta técnica permite registrar el comportamiento eléctrico de la membrana de una única neurona gracias al establecimiento de comunicación directa entre el medio interno (citoplasma) de dicha neurona y el líquido que se encuentra en el interior de la micropipeta.

7.1. Registro en rodaja.

En los apartados 1 y 2 de Resultados se utilizó el método ciego (Blanton et al. 1989; Coleman & Miller 1989) para registrar intracelularmente por *patch-clamp* en célula entera las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo. En el apartado 3 de Resultados, sin embargo, se realizó *patch-clamp* visual con un microscopio (BX51W, lente de 60x, Olympus). Para dichos registros se emplearon micropipetas de vidrio fabricadas a partir de capilares de vidrio (borosilicato de 0.86 mm de diámetro interno), utilizando un estirador de micropipetas horizontal (Sutter Instruments). Posteriormente, las micropipetas se rellenaron con solución intracelular (Soluciones A y C, Tabla M2) presentando unas resistencias de entre 4 y 10 M Ω .

Para obtener los registros de las neuronas piramidales en rodaja, se situó la micropipeta sobre el *stratum pyramidale* de CA1, con una disposición paralela a la capa de somas (Figura M4). Se aplicó una presión positiva en el interior de la micropipeta utilizando una jeringa conectada por un tubo de polietileno al soporte (*holder*) de la micropipeta, para evitar que algún resto de tejido tapone la punta de la micropipeta, mientras se va introduciendo en el tejido mediante un micromanipulador. Durante todo este proceso se aplicaron pulsos negativos de voltaje (3 mV de amplitud, 60 ms de duración, frecuencia de 5 Hz) a través de la punta de la micropipeta mediante el amplificador (Axoclamp 2A) en modo de registro de fijación de voltaje a 0 mV, mientras se monitorizaba la corriente registrada en el osciloscopio. Cuando se observó una disminución en el tamaño del pulso de corriente, supuestamente producida por el acercamiento de una membrana de una célula a la punta de la micropipeta (mediante el método visual se observaba este acercamiento), se ejerció presión negativa a través de la jeringa. En muchas ocasiones se formó un sello entre la punta de la micropipeta y dicha membrana, detectándose en el osciloscopio mediante un aumento de la resistencia de la micropipeta hasta valores de gigaohmios. Cuando el sello era estable, tras fijar

el voltaje a -65 mV, se realizó una ligera succión para abrir el parche de la membrana, comunicando el interior de la micropipeta con el citoplasma celular.

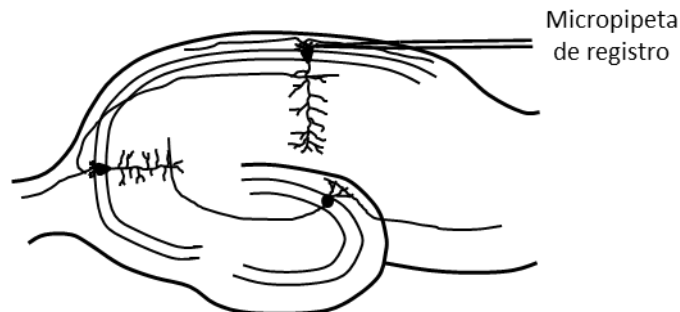


Figura M4: Esquema del registro intracelular en rodaja de una neurona piramidal de CA1.

En todos los experimentos realizados en rodajas de hipocampo, una vez se rompió el sello, se realizaron los registros en fijación de corriente. Este modo se caracteriza porque el amplificador inyecta la corriente seleccionada, y la neurona responde a esa inyección de corriente cambiando su potencial de la membrana en función de sus propiedades pasivas y activas. Este modo de registro permite una fijación relativamente estable a un determinado potencial de la membrana a través de la inyección de corriente continua. La fijación de un potencial de la membrana mediante la aplicación de una determinada cantidad de corriente continua no es tan precisa como la conseguida en modo de fijación de voltaje por los siguientes motivos:

- El tiempo de respuesta es dependiente de la constante de tiempo de la membrana, por lo que es difícil la fijación a un determinado voltaje durante intervalos de tiempo muy pequeños.
- Puede cambiar el potencial de la membrana de la neurona durante la fijación a un potencial de la membrana subumbral si hay variaciones de la resistencia de la membrana o del potencial de la membrana en reposo.
- Al fijar la membrana a un potencial supraumbral, la neurona responde con el disparo de potenciales de acción, por lo que el potencial de fijación no se va a estabilizar hasta que se inactiven los canales de sodio implicados en la generación de los potenciales de acción (PAs).

Los registros fueron adquiridos a través de un *Headstage* HS-2 de ganancia 0,1 acoplado al amplificador Axoclamp 2A y digitalizado con el conversor analógico-digital Digidata 1322 (Molecular Devices). Como electrodo de referencia se utilizó una píldora de plata clorada sumergida en la solución de perfusión de la cámara de registro, conectada a un cable que, en su otro extremo, se unió al conector de tierra del *Headstage*. Las neuronas incluidas en este estudio tuvieron un potencial de la membrana en reposo más negativo que -60 mV y el pico de sus PAs más positivo que los 0 mV. En todos los registros se compensó la resistencia en serie y el artefacto capacitivo.

7.2. Registro de células disociadas.

En el caso del registro de células disociadas se realizó *patch-clamp* visual con un microscopio (U-TV1X, lente de 40x, Olympus) conectado a una cámara (SSC-M370CE, Sony). (Figura M3). Se utilizaron unas micropipetas similares a las empleadas para el registro en rodaja, pero modificadas para que la punta de la micropipeta fuera más corta y de mayor diámetro. Posteriormente, las micropipetas se rellenaron con la solución intracelular (Solución B, Tabla M2), presentando unas resistencias de entre 3 y 7 M Ω . Para realizar el sello no es necesaria la aplicación de presión positiva en la punta de la micropipeta debido a que no hay tejido que pudiera obstruir la punta de la micropipeta. Se situó la micropipeta encima de una de las células disociadas mediante un micromanipulador, y se descendió la punta del electrodo hasta hacer contacto con la membrana plasmática de la neurona. El resto de la técnica fue similar a la descrita para el registro de neuronas piramidales en rodajas, a excepción de:

- El amplificador empleado fue Axopatch 200B.
- El pulso negativo para la obtención del sello, que en el caso del amplificador Axopatch 200B fue de 5 mV de amplitud y 10 ms de duración.

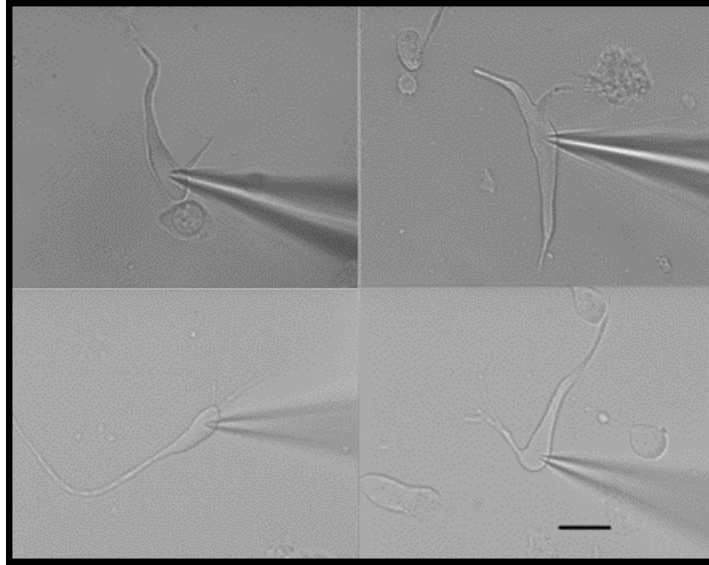


Figura M5: Imágenes de neuronas piramidales de CA1 recién disociadas, registradas con la técnica de *patch-clamp*.

Los registros en fijación de voltaje en neuronas piramidales disociadas se realizaron con el amplificador Axopatch 200B. Se digitalizaron las señales analógicas mediante el conversor analógico-digital Digidata 1322. Se eligieron para registrar aquellas neuronas que presentaban un tono brillante y uniforme. Las neuronas bajo estas condiciones aguantan hasta 40 minutos de registro. Sólo se utilizaron aquellas neuronas que presentaron una resistencia de acceso por debajo de $20\text{ M}\Omega$ y una resistencia de la membrana por encima de $150\text{ M}\Omega$. Se registraron las células con una capacidad de la membrana de entre 10 y 30 pF . En todos los registros se compensó la resistencia y la capacidad de la membrana un 80 %.

8. Análisis de los registros electrofisiológicos.

Todos los registros fueron digitalizados a 20 kHz y analizados con los programas pClamp 10.2 y Origin. Al emplear distintos líquidos intracelulares y extracelulares, el *junction potential* varía de unos experimentos a otros. Por lo tanto, se ha corregido el *junction potential* en todos los datos que se muestran en esta tesis para que sean comparables entre sí.

8.1. Medición de las propiedades básicas de la membrana.

El potencial de la membrana en reposo (V_m), se midió al inicio de los registros, antes de fijar la célula a un voltaje determinado.

El resto de las propiedades básicas de la membrana se midieron manteniendo las células en modo de fijación de corriente a -60 mV y -80 mV (en el apartado 3 de Resultados sólo se midió a -80 mV). Se eligieron estos potenciales de la membrana para evaluar las propiedades pasivas de la membrana en las condiciones en las que se realizaron el resto de experimentos. Además, la medición a un mismo potencial de la membrana permite reducir la variabilidad de las propiedades pasivas entre las distintas neuronas producidas por corrientes dependientes de voltaje. Para calcular la resistencia, capacidad, y constante de tiempo de la membrana, se calculó a partir de la respuesta de voltaje producida tras la administración de pulsos cuadrados de corriente hiperpolarizante a través de la micropipeta de registro, de -20 pA de amplitud y 300 ms de duración (Figura M6).

El valor de la resistencia de la membrana (R_m) se calculó mediante la Ley de Ohm. Es decir, la relación entre la intensidad del pulso de corriente (I) y la diferencia de voltaje (ΔV) que genera este pulso ($R_m = \Delta V/I$), donde ΔV es la diferencia entre el voltaje inicial (V_i) antes del pulso y el voltaje final que se alcanzaría de forma pasiva si no existieran conductancias dependientes de tiempo y voltaje. Para calcular este voltaje final se tomó el fragmento del comienzo del registro y a partir del mismo se realizó una simulación en el programa pClamp 10.2, obteniendo un valor máximo estable para ese pulso sin la interferencia de las conductancias activadas por hiperpolarización (Figura M6).

Si la membrana neuronal sólo tuviera propiedades resistivas, un pulso de corriente que atraviesa la misma provocaría un cambio de potencial instantáneo. Sin embargo, la membrana

tiene propiedades capacitivas además de las resistivas. Este comportamiento como condensador produce una reducción de la velocidad a la que cambia el potencial de la membrana en respuesta a un pulso de corriente. El tiempo que tarda en alcanzar el voltaje máximo varía dependiendo de las propiedades capacitivas y resistivas de cada neurona. Para conocer dichas propiedades se estudia la constante de tiempo de la membrana (τ), que se define como el producto de la resistencia a la entrada de corriente por la capacidad de la membrana. La constante de tiempo se calculó experimentalmente, correspondiendo al tiempo necesario para que el cambio del potencial de la membrana sea el 63 % de su valor máximo estable (Figura M6).

La capacidad de la membrana (C_m) se calculó a partir de la relación de la constante de tiempo y la resistencia de la membrana ($C_m = \tau / R_m$).

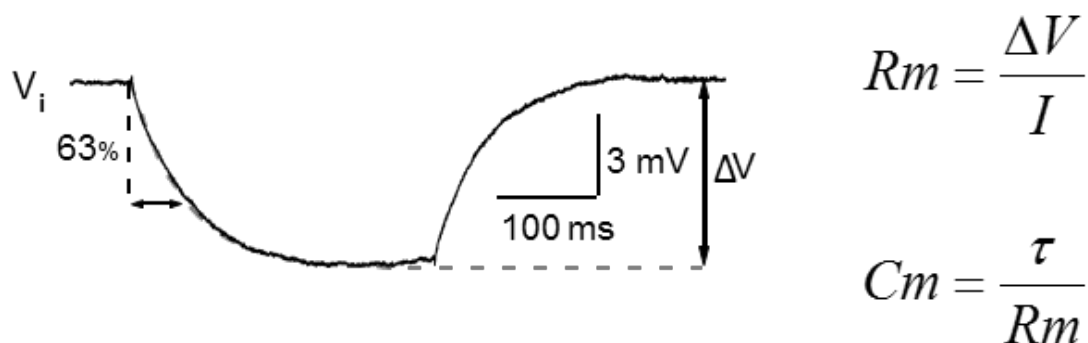


Figura M6: Medición de las propiedades pasivas de la membrana.

Registro de un pulso negativo de 300 ms de duración y una intensidad de -20 pA en fijación de corriente. La línea gris discontinua representa la simulación realizada con el programa pClamp 10.2.

8.2. Medición de los parámetros del potencial de acción.

Los parámetros del PA fueron analizados en el primer PA inducido tras un pulso de corriente despolarizante (Figura M7), a excepción del estudio de la morfología de los PAs durante un tétanos (sección 1.3 de Resultados), en el que se analizaron los parámetros de cada PA generado por los distintos tétanos.

El umbral de disparo fue definido como el voltaje en el que la velocidad de despolarización sobrepasaba los 10 mV/ms. Criterios similares han sido adoptados por otros

autores (Stuart et al. 1997; Fricker et al. 1999; Muñoz-Cuevas et al. 2004; Sánchez-Alonso et al. 2010; Sánchez-Alonso et al. 2012).

La amplitud del PA se calculó como la diferencia entre el valor del umbral de disparo y el voltaje más despolarizado que alcanzó el PA.

La duración media del PA se calculó como el tiempo que transcurre desde que el PA alcanza el 50 % de su amplitud máxima hasta que decae al mismo voltaje.

La velocidad de despolarización se calculó mediante la pendiente de la despolarización del PA, situada entre los puntos correspondientes al 10% y 90% de la amplitud del PA en su fase ascendente.

En cuanto a la velocidad de repolarización, se estudió en dos tramos:

- En el primer tercio de la fase repolarizante, empezando 0,3 ms después del pico del PA, siguiendo el criterio utilizado por Muñoz-Cuevas y colaboradores (2004). El análisis de este tramo es importante ya que la corriente tipo A de potasio, que tiene un papel destacado en el transcurso de esta tesis, tiene su activación máxima durante el primer tercio de la repolarización del PA (Mitterdorfer & Bean 2002).
- Además, en el apartado 3 de Resultados se midió también en la segunda mitad de la fase repolarizante, región que depende de corrientes de potasio dependientes de calcio (Lancaster & Nicoll 1987; Storm 1987). Para ello, se midió la pendiente situada entre los puntos correspondientes al 50% y 20% de la amplitud del PA en su fase repolarizante.

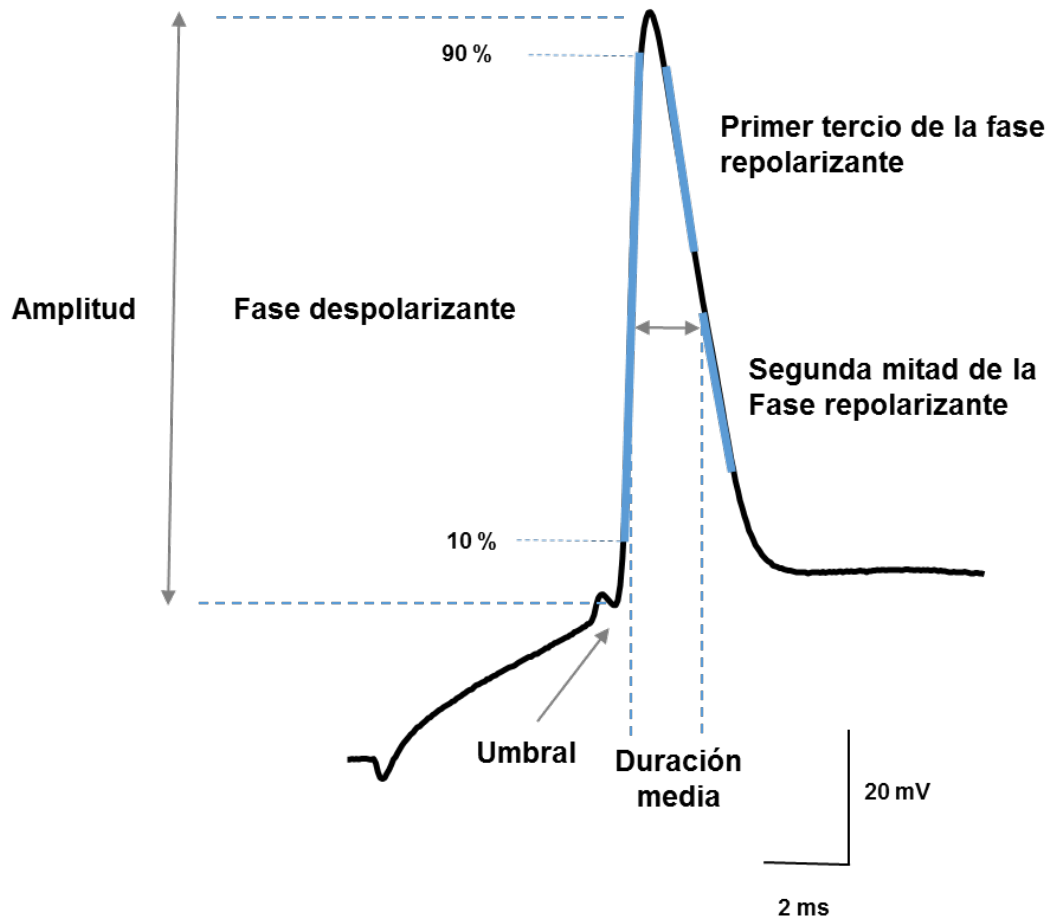


Figura M7: Medición de los parámetros del PA.

8.3. Interpretación de los diagramas de fase.

La representación más usual del PA (potencial de la membrana frente al tiempo) no permite visualizar claramente posibles cambios en las velocidades de despolarización y repolarización debido a la rapidez del evento. Para observar de forma más clara estos parámetros, se realizaron diagramas de fase representando la evolución del PA como la velocidad de cambio de voltaje (primera derivada del PA con respecto al tiempo, mV/ms) frente al potencial de la membrana que presenta el PA en cada instante (Figura M8).

En estos diagramas de fase, el umbral de disparo se corresponde con el punto de inflexión ascendente desde la región más hiperpolarizada, donde la derivada del potencial de

la membrana frente al tiempo es aproximadamente 0. Se tomó como umbral el punto en el que la derivada superaba los 10 mV/ms.

El pico del PA es el punto con el potencial de la membrana más despolarizado, cuya derivada del potencial de la membrana frente al tiempo es igual a 0 mV/ms

La fase despolarizante se corresponde con la región cuya derivada del potencial de la membrana frente al tiempo es superior a 0 mV/ms.

La fase repolarizante es la región cuya derivada del potencial de la membrana frente al tiempo es inferior a 0 mV/ms.

En los diagramas de fase, se puede ver la evolución de las distintas fases del PA en cada potencial de la membrana, pudiéndose apreciar a qué voltajes son máximas las tasas de despolarización y repolarización.

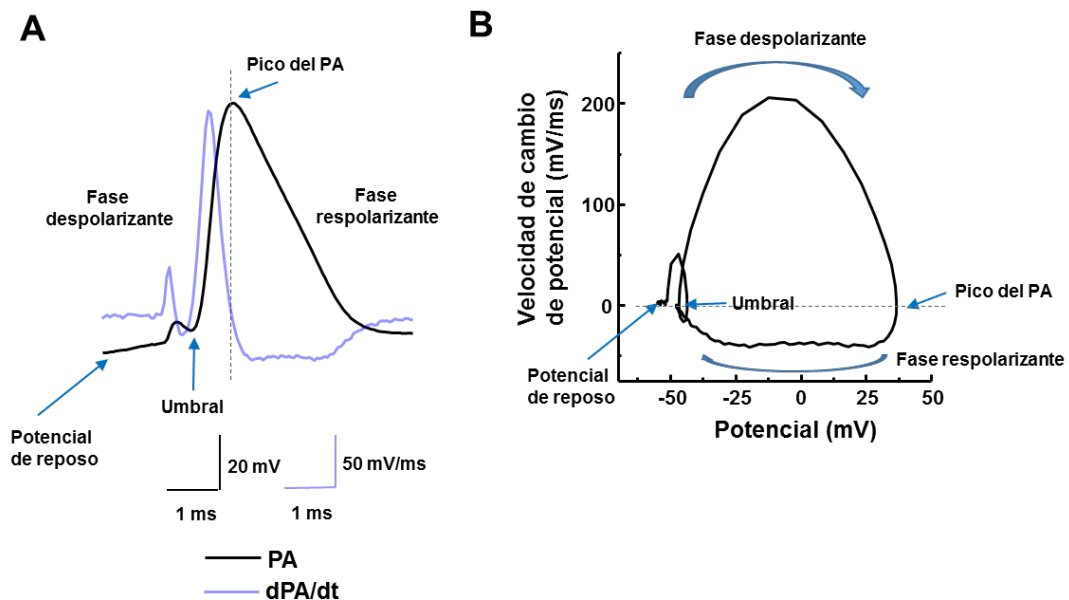


Figura M8: Interpretación de un diagrama de fase.

Análisis del PA mediante un diagrama de fase que representa el potencial de la membrana frente a la primera derivada del PA con respecto al tiempo.

- A)** Representación del PA (trazo negro) con algunos de sus parámetros. La línea discontinua separa la fase despolarizante (izquierda) de la fase repolarizante (derecha). También se representa la primera derivada del PA con respecto al tiempo (trazo azul).
- B)** Diagrama de fase en el que la fase despolarizante se corresponde con los valores positivos y la fase repolarizante con los valores negativos de la gráfica. El umbral coincide con la inflexión de la gráfica hacia valores positivos. Se tomó el punto en el que la dV/dt superaba los 10 mV/ms. El pico del PA es el valor de potencial de la membrana más despolarizado y coincide con un valor de $dV/dt = 0$ mV/ms.

Figura adaptada del artículo de Trombin y colaboradores (2011).

8.4. Cálculo de los porcentajes de plasticidad.

Para estudiar el perfil temporal del proceso de inducción de la plasticidad se definió el porcentaje de plasticidad como:

$$\% \text{ Plasticidad} = \left[\frac{PAR_{1s} - PAR_{test}}{PAR_{1s} - PAR_{15min}} \right] * 100$$

Donde PAR_{test} es el valor del parámetro (duración media o velocidad de repolarización) del PA generado para cada intervalo de tiempo de despolarización expresado en segundos (1, 15, 30, 60, 90, 180, 300, 450, 600 y 900), PAR_{1s} es el valor del parámetro del PA generado tras 1 segundo de despolarización (intervalo de tiempo tras el cual no parece observarse plasticidad, considerándose el 0 % de plasticidad) y PAR_{15min} es el valor del parámetro del PA generado a los 15 minutos de despolarización (intervalo en el que la plasticidad es máxima, considerándose como 100 % de plasticidad).

Para estudiar el perfil temporal del proceso de extinción de la plasticidad se definió el porcentaje de plasticidad como:

$$\% \text{ Plasticidad} = \left[\frac{PAR_{15min} - PAR_{test}}{PAR_{15min} - PAR_{1s}} \right] * 100$$

Donde PAR_{test} es el valor del parámetro del PA generado para cada intervalo de tiempo de hiperpolarización expresado en segundos (1, 15, 30, 60, 90, 180, 300, 450, 600 y 900), PAR_{1s} es el valor del parámetro del PA generado tras 1 segundo de hiperpolarización (intervalo de tiempo tras el cual la plasticidad se mantiene, y por tanto se tomó como 100 % de plasticidad) y PAR_{15min} es el valor del parámetro del PA generado a los 15 minutos de hiperpolarización (intervalo en el que la plasticidad se ha extinguido por completo, considerándose como 0 % de plasticidad).

8.5. Medición de los parámetros de la despolarización post-potencial.

La despolarización post-potencial (ADP, *after-depolarization potential*) se generó tras una inyección de corriente despolarizante de 5 ms, con una intensidad suficiente para generar un PA, en registros de fijación de corriente. Se analizó la duración media y la amplitud máxima de la ADP (Figura M9A).

La amplitud máxima de la ADP se midió como la diferencia entre el pico máximo de voltaje del ADP y el potencial de la membrana de fijación. Algunas células no presentan un pico máximo bien definido, en estos casos el valor de voltaje tomado como máximo fue aquel que coincidía en el tiempo con el promedio de los picos máximos de las células que sí presentan un pico bien definido. En los experimentos con baja concentración extracelular de calcio, se midió el valor del potencial de la membrana al tiempo del pico máximo de voltaje de la ADP de esa misma célula cuando la solución extracelular es de calcio 3 mM (Figura M9B).

El inicio de la ADP se definió como el tiempo en el que el PA alcanza su valor mínimo de velocidad de repolarización, medida a partir de la primera derivada frente al tiempo. El intervalo de tiempo entre el inicio del ADP y el tiempo en el cual ha caído un 50% de su amplitud máxima es lo que se toma como duración media.

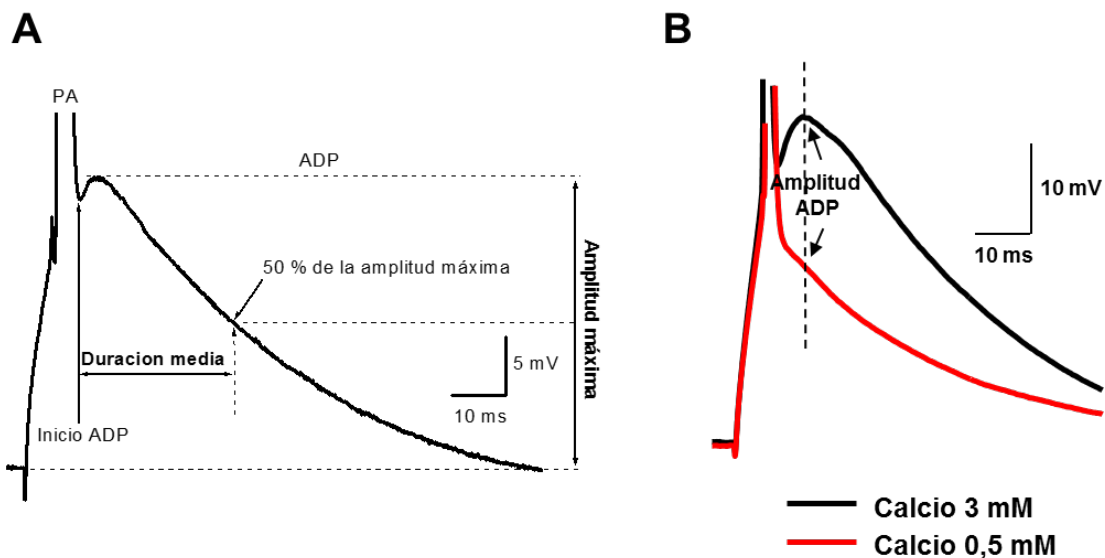


Figura M9: Registro de un PA y su ADP.

- A) Medición de la amplitud y la duración media de la ADP.
- B) En los experimentos con baja concentración extracelular de calcio, se midió la amplitud en el tiempo del pico máximo de voltaje de la ADP obtenida con la solución extracelular de 3 mM.

8.6. Clasificación del patrón de disparo.

Las neuronas piramidales de CA1 presentan dos modos de disparo ante un pulso despolarizante: un disparo en ráfagas o un disparo regular (Figura M10). Aunque el comportamiento en la mayoría de los casos se puede distinguir claramente se realizó un estudio de los intervalos de tiempo entre los PAs para clasificar con mayor rigor a las neuronas, siguiendo el criterio establecido por Sánchez-Alonso y colaboradores (2010). Para cada célula se seleccionaron registros en los que se generaron entre 4 y 8 PAs en respuesta a un pulso despolarizante de entre 0,3 y 1 segundo de duración. En ellos se midieron los intervalos de tiempo entre cada PA (ISI, *interspike interval*) y se calculó el ISI ratio (*interspike interval ratio*), que Metz y colaboradores (2005) definieron como el cociente entre el ISI mínimo del pulso y el ISI promedio de dicho pulso. Cuando este ISI ratio fue menor de 0,4, el patrón de disparo de la célula se clasificó como disparo en ráfagas, y cuando el ISI ratio fue mayor de 0,4 se consideró como disparo regular.

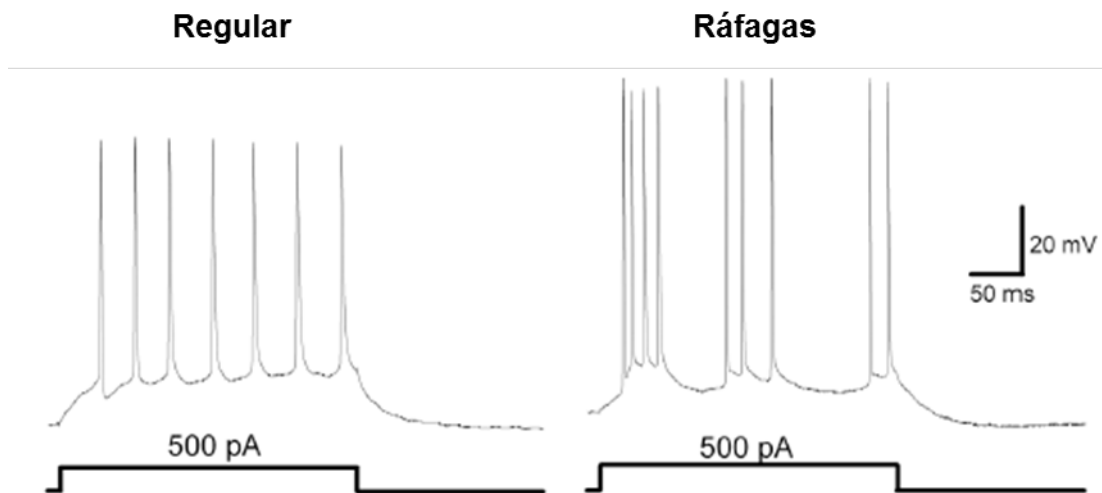


Figura M10: Patrones de disparo en neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo de rata.

Registros representativos de un patrón de disparo regular (izquierda) y de un patrón de disparo en ráfagas (derecha).

8.7. Medición de la intensidad de corriente tipo A en los experimentos de fijación de voltaje.

La cantidad de corriente registrada en una neurona es dependiente del tamaño celular. No obstante, como las comparaciones fueron dentro de las propias células y no varió su capacidad durante el experimento, se realizó el análisis con la intensidad de corriente tipo A máxima.

El protocolo de aislamiento se explica detalladamente en la sección 2.4 de Resultados. La amplitud al pico para cada caso se midió con respecto a la línea base que se corresponde con el valor de 0 pA debido a la sustracción.

La corriente tipo A generada se aisló:

- 1º. Farmacológicamente, se bloquearon las corrientes de sodio dependientes de voltaje y la corriente de calcio de alto umbral tipo L mediante la aplicación de los bloqueantes específicos, tetrodotoxina (TTX, 0.5 μ M) y nifedipina (10 μ M) respectivamente, a la solución extracelular.
- 2º. Electrofisiológicamente, se aisló la corriente tipo A aprovechando su rápida cinética de inactivación, propiedad que la distingue del resto de corrientes de potasio. Para ello, se realizó el siguiente protocolo, adaptado de Jung y Hoffman (2009) (Figura R33A): Partiendo del potencial basal, se midió la corriente de salida generada por un pulso de voltaje test, de 1.5 segundos de duración y que despolarizó la membrana a +40 mV. El pulso test fue precedido de:
 - Un prepulso de voltaje de 150 ms que hiperpolarizó la membrana a -120 mV. Precedido de este prepulso, el pulso test generó una corriente de salida con dos componentes cinéticos de inactivación: uno rápido, producido por la I_A , y otro lento, en el que estaban implicadas el resto de corrientes de potasio.
 - Un prepulso de voltaje de 150 ms que despolarizó la membrana a -20 mV, inactivando las corrientes transitorias (Connor & Stevens 1971b; Numann et al. 1987; Klee et al. 1995; Mitterdorfer & Bean 2002). Precedido de este prepulso, el pulso test generó una corriente de salida de inactivación lenta, debido a que se inactivaron la mayoría de los canales implicados en la I_A .

Sustrayendo la corriente generada con el prepulso que despolarizó la membrana a -20 mV de la generada tras hiperpolarizar la membrana a -120 mV, quedó aislada la corriente A (figura R33B).

8.8. Obtención de la constante de tiempo de caída de las corrientes en los experimentos en fijación de voltaje.

Las cinéticas de inactivación indican cómo decae la corriente a lo largo del tiempo a un voltaje determinado. Para el estudio de la misma se calculó la constante de tiempo de caída, que es el tiempo que tarda la corriente en caer un 63% de su amplitud total (Figura M11).

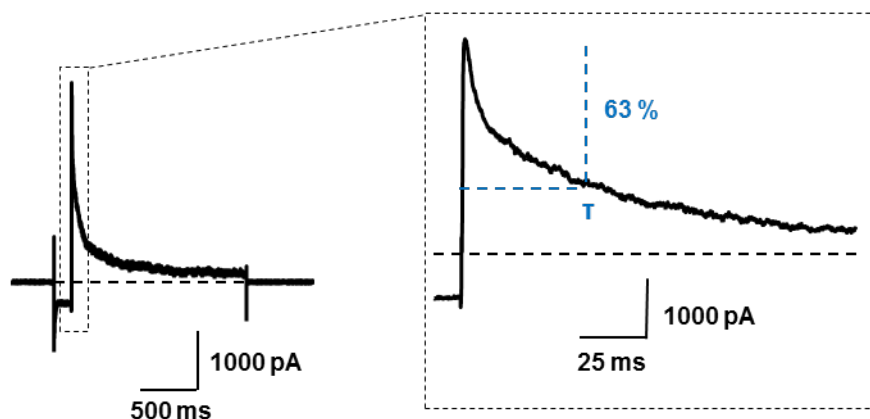


Figura M11: Medición de la constante de tiempo de inactivación de la corriente de potasio tipo A.

Registro representativo de la corriente tipo A, con una ampliación de los primeros 150 milisegundos desde su generación. La constante de tiempo de inactivación se midió cuando la corriente disminuyó un 63 % del pico máximo de corriente.

9. Western blot.

9.1. Extracción de proteínas de la membrana.

Se extrajeron los hipocampos de ratas con una edad de P10, P17 y P31 siguiendo el mismo proceso que para la obtención de las rodajas empleadas para los registros de electrofisiología. Se juntaron los hipocampos de una a dos ratas por cada muestra y se homogeneizaron en un tampón de lisis frío compuesto por tampón fosfato salino 0,01 M, pH 7,4 (PBS), al que se le añadieron los siguientes inhibidores de proteasas o fosfatasas: EGTA 5 mM, ditioneitol 5 mM, fluoruro sódico 10 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM y un cóctel inhibidor de proteasas a concentración 2x (una pastilla/ 5 ml) (Roche, Basel, Suiza).

Posteriormente se eliminaron los núcleos mediante una centrifugación a 3000 g y 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante se volvió a centrifugar a 150000 g y 4°C durante 17 minutos para obtener una “fracción de la membrana” en el precipitado, que seguidamente fue resuspendida en tampón de lisis frío sin ditioneitol. Se determinó la concentración de proteínas usando el reactivo *Protein Assay* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), basado en el método colorimétrico de Bradford. Se utilizó albúmina de suero bovino como patrón de proteínas de concentración conocida.

9.2. Preparación de las muestras para *Western blot* en condiciones desnaturalizantes.

Cantidades iguales de proteína total (10 µg) de las distintas muestras se desnaturalizaron a 70°C durante 10 minutos diluidas en tampón de carga (Tris 150 mM pH 7,5, dodecil sulfato sódico 5 %, azul de bromofenol 0,02 % y β-mercaptoetanol 5 %). Seguidamente, tras enfriar a temperatura ambiente, se cargaron las muestras en los pocillos de un gel de

poliacrilamida al 6,5 % (Tabla M3). En cada gel se cargó también un marcador de pesos moleculares conocidos preteñido (Invitrogen).

Tabla M3: Composición de los geles de poliacrilamida empleados en la electroforesis.

Gel concentrador	Concentración	Gel separador	Concentración
Tampón concentrador (Tris 0,12M, SDS 0,1 %, pH 6,8)	1x	Tampón separador (Tris 0,37M, SDS 0,1 %, pH 8,8)	1x
Acrilamida/Bis-acrilamida 30 %	3 %	Acrilamida/Bis-acrilamida 30 %	6,5 %
TEMED	0,15 %	TEMED	0,06 %
APS	1,5 %	APS	1,3 %

La electroforesis se llevó a cabo en un equipo Mini-PROTEAN (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a 125 V durante aproximadamente 90 minutos, empleando como tampón de electroforesis Tris-Base 25 mM con glicina 191,7 mM y dodecil sulfato sódico (SDS) 0,1 %.

Una vez separadas las proteínas en función de su peso molecular, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham, GE Healthcare) mediante un equipo de transferencia húmeda mini-Trans-Blot (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a 25 V durante toda la noche. Se empleó como tampón de transferencia Tris-base 48 mM con glicina 39 mM, SDS 0,037 % y metanol 20 %. La eficacia de la transferencia de proteínas se comprobó mediante una tinción reversible con una solución de rojo Ponceau (Ponceau S 0,1 % en ácido acético 5 %).

9.3. Análisis del *Western blot*.

Las membranas se bloquearon con leche desnatada al 5 % en PBS con 0,1 % de Tween 20 (PBS-T) y se incubaron con anticuerpos primarios anti Cav3.2 y anti-Kv4.2 (Tabla M4). La inmunodetección se realizó con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (Tabla M4). La detección de la señal se llevó a cabo por quimoluminiscencia con los reactivos ECL (Amersham, GE Healthcare). Tras la reacción se puso la membrana en contacto con una película de autorradiografía Hyperfilm ECL (Amersham, GE Healthcare) durante 1 hora 10

minutos, y 15 minutos sucesivamente. El revelado de la película se realizó manualmente con revelador G153 y fijador G354 (Agfa).

La película autorradiográfica fue escaneada y la densitometría de las bandas se llevó a cabo mediante el programa Quantity One (Bio-Rad). La densidad de cada banda se normalizó con respecto a la banda de actina, que se empleó como control de carga, y se calculó el cociente Cav3.2/Kv4.2. Una vez normalizados los valores densitométricos con respecto al control de carga, se representaron los porcentajes relativos al grupo de edad P10.

Tabla M4: Anticuerpos primarios y secundarios empleados para la inmunodetección de proteínas separadas por PAGE-SDS.

Anticuerpo	Tipo Anticuerpo	Origen	Dilución	Procedencia
Cav3.2	Primario	Conejo	1:1500	AlomoneLabs
Kv4.2	Primario	Ratón	1:800	Acris Antibodies
β -actina	Primario	Ratón	1:10000	Sigma
Anti-IgG de conejo	Secundario	Ratón	1:10000	Jackson InmunoResearch
Anti-IgG de ratón	Secundario	Rata	1:10000	Jackson InmunoResearch

10. Análisis estadístico.

En general los datos procedentes de cada tipo de experimento se presentan como promedio \pm error estándar. Los test estadísticos más utilizados se basaron en la determinación de la diferencia de medias entre los grupos mediante el estadístico de contraste de la *t* de Student. En el caso de que los datos a comparar pertenezcan a una misma neurona en dos condiciones diferentes, se realizó la *t* de Student para muestras pareadas. Por el contrario, en comparaciones entre diferentes neuronas, se empleó la *t* de Student para muestras independientes. Por último, para comparaciones porcentuales entre dos condiciones de una misma neurona se realizó la *t* de Student para una muestra (usualmente tomando como 100 % al grupo control).

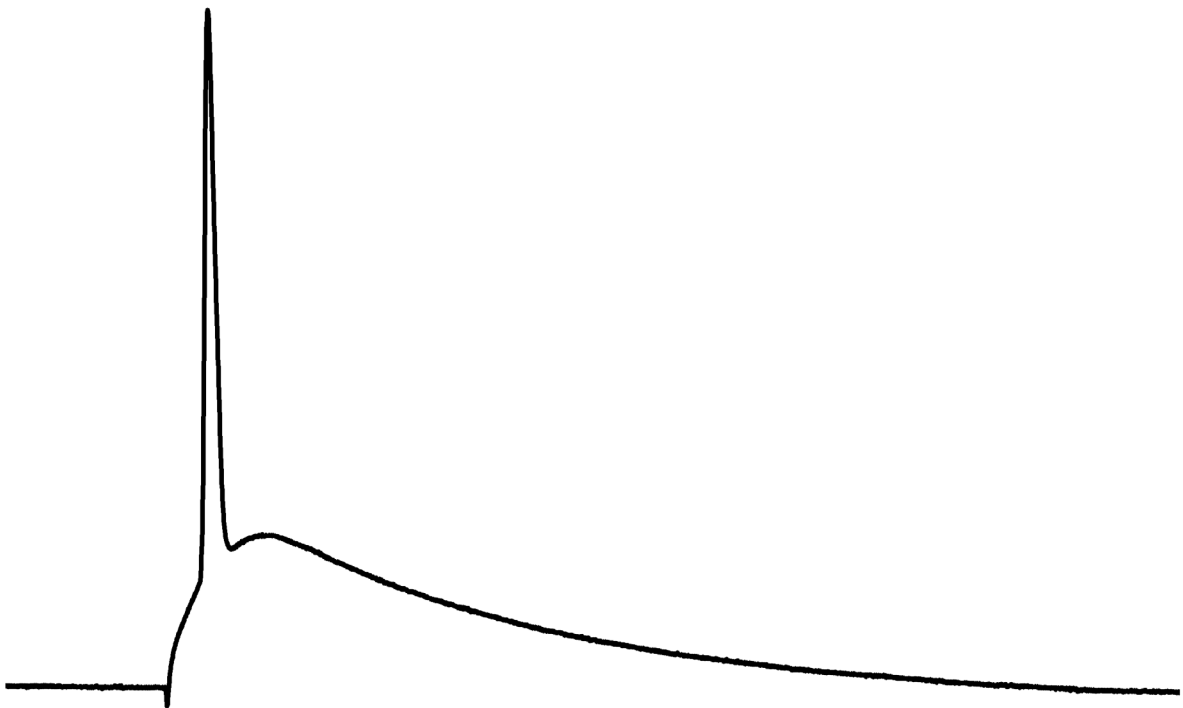
Los experimentos con más de dos condiciones experimentales se compararon mediante un análisis de la varianza (ANOVA) para un factor. En experimentos con más de dos niveles del tratamiento dentro de la misma célula (como en los experimentos con distintas concentraciones de calcio extracelular), las comparaciones se realizaron mediante un ANOVA de un factor con muestras repetidas. Se empleó la prueba de Bonferroni como test *a posteriori* para las comparaciones dos a dos entre las diferentes condiciones. En experimentos con dos factores (como la evolución de los parámetros de los PAs durante el tétanos o las curvas de entrada-salida) se realizó una comparación mediante un ANOVA para dos factores. Seguidamente, las diferencias entre las distintas condiciones de los factores objeto de estudio se compararon mediante el test correspondiente de entre los descritos con anterioridad.

En algunos casos se realizó estadística no paramétrica, cuyo test empleado se indica en Resultados.

En las figuras que muestran diferencias estadísticamente significativas utilizando varios tipos de test diferentes, se especifica la simbología de cada test en el pie de la figura.

Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de *P* resultó inferior a 0,05. Para todos los análisis estadísticos se utilizó el programa SPSS 17.

RESULTADOS



1. Evolución de la excitabilidad intrínseca de las neuronas piramidales de CA1 durante las primeras etapas del desarrollo postnatal.

1.1. Estudio de las propiedades pasivas de la membrana en el desarrollo postnatal.

El primer mes de desarrollo postnatal constituye una importante etapa para la maduración funcional del hipocampo. En dicho período, las neuronas piramidales del hipocampo de rata sufren considerables modificaciones en sus propiedades electrofisiológicas y morfológicas (Pokorny & Yamamoto 1981a; Pokorny & Yamamoto 1981b; Schwartzkroin & Kunkel 1982; Vasilyev & Barish 2002). Estudios previos de éste y otros laboratorios describieron cambios en las propiedades electrofisiológicas básicas de las neuronas piramidales de CA1 durante este período de desarrollo (Zhang et al. 1991; Spigelman et al. 1992; Sánchez-Alonso et al. 2010). Con el fin de estudiar las propiedades pasivas de la membrana de las neuronas empleadas a lo largo del desarrollo, se realizaron registros de *patch-clamp* en fijación de corriente en neuronas piramidales de CA1 procedentes de ratas pertenecientes a dos intervalos de edad: uno formado por ratas de entre 9 y 12 días (P9-12), y otro formado por ratas de entre 16 y 19 días (P16-19). En ambos grupos se midió el potencial de la membrana en reposo y se calculó la resistencia, la capacidad y la constante de tiempo de la membrana a dos potenciales de fijación (-80 mV y -60 mV), en función de su respuesta a la inyección intrasomática de corriente mediante pulsos cuadrados con una intensidad de corriente de -20 pA y una duración de 300 ms.

Tras comparar los dos grupos de edad, se observó una hiperpolarización del potencial de la membrana en reposo con el avance del desarrollo ($P < 0,001$, Tabla R1). Además, la constante de tiempo y la resistencia de la membrana fueron estadísticamente menores ($P < 0,001$ para todos los análisis, Tabla R1) y la capacidad de la membrana estadísticamente mayor ($P < 0,001$, Tabla R1) en el grupo P16-19 respecto al P9-12 a ambos potenciales de fijación.

Tabla R1. Cambios en las propiedades electrofisiológicas básicas producidos durante el desarrollo entre los 9 y 19 días.

Potencial	-80 mV		-60 mV	
Edad	P9-12	P16-19	P9-12	P16-19
Vm reposo (mV)	-70,3 ± 0,3	-72,1 ± 0,2***	-70,3 ± 0,3	-72,1 ± 0,2***
Resistencia de la membrana (MΩ)	189,5 ± 6,3	94,2 ± 1,4***	379,9 ± 11,2	209,0 ± 3,9***
Capacidad de la membrana (pF)	129,9 ± 3,0	212,4 ± 3,5***	133,1 ± 3,0	206,2 ± 3,9***
Constante de tiempo (ms)	23,3 ± 0,5	19,7 ± 0,4***	48,8 ± 1,2	41,8 ± 0,8***
Número de células	100	188	100	188

Los valores de potencial de la membrana en reposo se obtuvieron antes de fijar la membrana a los potenciales estudiados.

P9-12 vs P16-19, *** P < 0,001.

La Figura R1 refleja los cambios que se producen en las propiedades pasivas de la membrana durante el desarrollo.

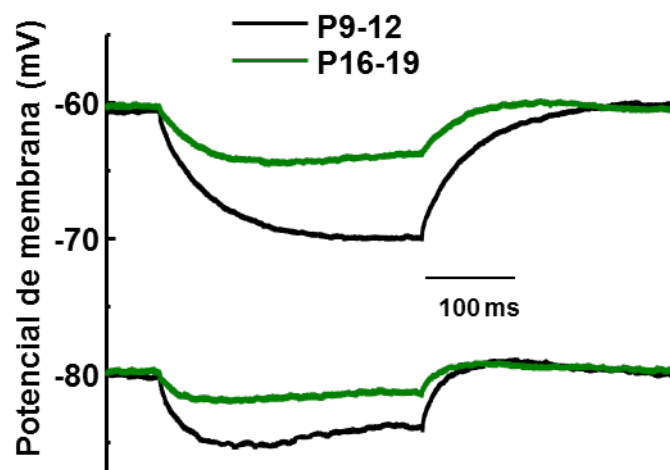


Figura R1. Influencia del desarrollo sobre las propiedades básicas de la membrana en neuronas piramidales de CA1.

Registros representativos del potencial de la membrana obtenido tras inyectar un pulso de corriente negativa de 20 pA en los grupos P9-12 (negro) y P16-19 (verde), tras fijar la membrana a -80 mV y a -60 mV.

En esta figura se pone de manifiesto que el pulso de voltaje es de mayor amplitud en el grupo P9-12 que en el del grupo P16-19, indicando que la resistencia y la constante de tiempo de la membrana son mayores a ambos potenciales de fijación.

1.2. Estudio de la morfología del potencial de acción en el desarrollo postnatal.

En las primeras semanas del desarrollo postnatal hay una maduración de algunas corrientes iónicas de las neuronas piramidales del hipocampo de rata, tales como la corriente de potasio tipo D, otras corrientes de potasio rectificadoras retardadas, las corrientes de potasio dependientes de calcio (Klee et al. 1995; Aoki & Baraban 2000; Giglio & Storm 2014), y las corrientes persistente y transitoria de sodio (Costa 1996; Potthoff & Dietzel 1997; Lunko et al. 2014). Como consecuencia, se ha demostrado una evolución en la morfología de los potenciales de acción (PAs) a medida que avanza el desarrollo postnatal (Zhang et al. 1991; Spigelman et al. 1992; Sánchez-Alonso et al. 2010; Sánchez-Alonso et al. 2012).

Para estudiar la evolución en la morfología del PA generado en las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo durante el desarrollo, se realizaron experimentos de *patch-clamp* en fijación de corriente, a un potencial de la membrana de -80 mV, en tres grupos de edad: entre 9 y 12 días (P9-12), entre 16 y 19 días (P16-19) y entre 30 y 50 días (P30-50). El PA se indujo mediante la inyección intrasomática de un pulso cuadrado de 5 ms de duración con la mínima intensidad de corriente despolarizante necesaria para generarlo (la cual se va a denominar como intensidad de corriente umbral).

Tras analizar los PAs generados mediante este protocolo, se observó que durante el desarrollo se produce (Tabla R2, Figura R2): hiperpolarización del umbral de voltaje de disparo e incrementos en la amplitud y en la duración media del PA, relacionados con un aumento de la velocidad de despolarización y una disminución de la velocidad de repolarización ($P < 0,001$ para todos los parámetros, ANOVA para un factor. El análisis mediante la prueba de Bonferroni demostró que todos los parámetros medidos en el grupo P9-12 eran estadísticamente diferentes a los encontrados en los grupos P16-19 y P30-50 – $P < 0,001$ –, mientras que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros de los PAs generados en los grupos P16-19 y P30-50). Estos resultados fueron similares a los descritos por otros autores (Zhang et al. 1991; Spigelman et al. 1992; Sánchez-Alonso et al. 2010; Sánchez-Alonso et al. 2012).

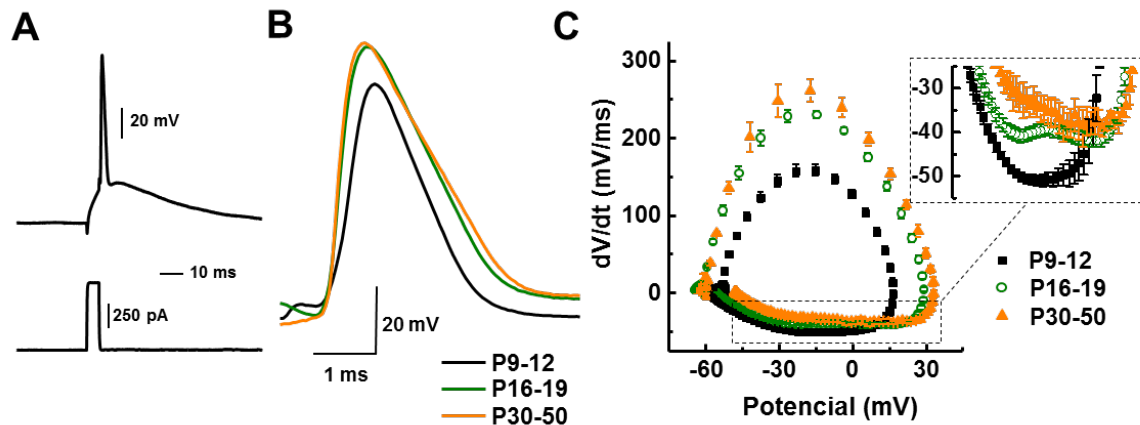


Figura R2. Evolución de la morfología de los PAs registrados en las neuronas piramidales de CA1 durante el desarrollo.

A) Ejemplo del protocolo empleado para la generación del PA. Se aplicó un pulso cuadrado de corriente despolarizante, con una duración de 5 ms y una intensidad de corriente umbral.

B) Registros representativos de los PAs generados tras aplicar un pulso cuadrado de 5 ms en neuronas procedentes de ratas de los grupos P9-12 (negro), P16-19 (verde) y P30-50 (naranja).

C) Diagramas de fase del promedio de los PAs generados en los grupos P9-12 (cuadrados negros, N=36 células), P16-19 (círculos verdes, N=24 células) y P30-50 (triángulos naranjas, N=4 células). En los diagramas se representa la velocidad de cambio de voltaje durante la evolución del PA (primera derivada del voltaje con respecto al tiempo, mV/ms) frente al potencial de la membrana que presenta el PA en cada instante. La fase de repolarización se muestra ampliada. Se puede apreciar cómo los PAs generados por las neuronas del grupo P9-12 tienen una velocidad de despolarización más lenta y una velocidad de repolarización más rápida que los PAs generados por neuronas de los grupos P16-19 y P30-50. Además se puede observar cómo los PAs generados en el grupo P9-12 presentan una menor amplitud y un umbral de disparo más despolarizado.

Para apreciar de forma más clara las diferencias en la morfología de los PAs generados, se realizaron diagramas de fase representando la evolución del PA como la velocidad de cambio de voltaje (primera derivada del PA con respecto al tiempo, mV/ms) frente al potencial de la membrana que presenta el PA en cada instante (ver Material y Métodos). Mediante dicha representación (Figura R2C) se puede observar cómo:

- La fase de despolarización del PA generado se hizo más rápida durante el desarrollo postnatal.
- La fase de repolarización del PA se hizo más lenta a lo largo del desarrollo postnatal.
- El umbral de voltaje de disparo fue más hiperpolarizado y la amplitud del PA fue mayor en los grupos P16-19 y P30-50, con respecto de los valores observados en el grupo P9-12.

Tabla R2. Evolución de algunos parámetros del PA a medida que avanza el desarrollo.

Edad	P9-12	P16-19	P30-50
Amplitud (mV)	72,1 ± 1,4	89,7 ± 1,2***	92,1 ± 1,9 ###
Umbral de disparo (mV)	-53,1 ± 0,5	-60,2 ± 0,6***	-58,8 ± 0,7 ###
Vel. despolarización (mV/ms)	142,8 ± 4,7	202,1 ± 3,5***	221,2 ± 13,7###
Vel. repolarización (mV/ms)	-53,1 ± 1,1	-42,1 ± 1,4***	-38,1 ± 2,3 ###
Duración media (ms)	1,21 ± 0,02	1,63 ± 0,04***	1,78 ± 0,06 ###
Número de células	36	24	4

P9-12 vs P16-19, *** P < 0,001.

P9-12 vs P30-50, ### P < 0,001.

1.3. Estudio de la morfología del potencial de acción durante un tétanos en desarrollo postnatal.

En la generación del PA interviene la corriente transitoria de sodio y las corrientes tipo A y tipo D de potasio, cuya activación e inactivación son dependientes de voltaje (Connor & Stevens 1971a; Connor & Stevens 1971b; Bean 2007; Johnston et al. 2010; Sánchez-Alonso et al. 2012). Durante un tétanos se afecta la morfología del PA, aumentando su duración, entre otras causas, por la inactivación progresiva de la corriente tipo A de potasio (Ma & Koester 1996; Kim et al. 2005).

A lo largo del desarrollo, la corriente tipo A de potasio disminuye (Klee et al. 1995; Sánchez-Alonso et al. 2012), la corriente transitoria de sodio aumenta (Costa 1996) y las corrientes de potasio tipo D y tipo BK aumentan (Aoki & Baraban 2000; Sánchez-Alonso et al. 2012). A fin de estudiar la morfología del PA tras un disparo repetitivo durante el desarrollo, se realizaron registros de *patch-clamp* en fijación de corriente en neuronas piramidales de CA1 de ratas procedentes de los grupos de edad P9-12 y P16-19, con el potencial de la membrana fijado en -80 mV. En esta serie de experimentos, se inyectó un tren de 10 pulsos cuadrados de 5 ms de duración, a frecuencias de 10 Hz, 20 Hz o 50 Hz y con intensidad de corriente de al menos 1,5 veces superior a la intensidad umbral (una intensidad suficiente para que en todos los pulsos se generara un PA) (Figura R3).

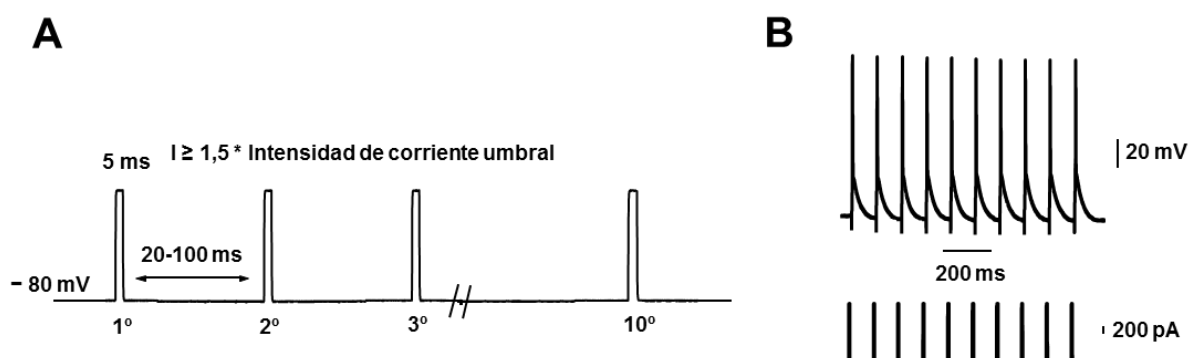


Figura R3. Protocolo empleado para estudiar el efecto del disparo repetitivo sobre la morfología del PA.

A) Diagrama del protocolo seguido para estudiar el efecto del disparo repetitivo sobre la morfología del PA. Partiendo de un potencial de la membrana de -80 mV, se aplicó una serie de 10 pulsos cuadrados despolarizantes, de 5 ms de duración, con una frecuencia de 10, 20 o 50 Hz, y con una intensidad de corriente inyectada de al menos 1,5 veces la intensidad de corriente umbral (intensidad suficiente para conseguir que se genere un PA en todos los pulsos).

B) Ejemplo del registro obtenido tras la aplicación del protocolo descrito en **A)**, con una frecuencia de 10 Hz. Se puede observar cómo con la intensidad de corriente inyectada (1350 pA), todos los pulsos generaron un PA.

Tras la aplicación de las tres frecuencias tetánicas, todos los parámetros del PA se modificaron al comparar el décimo con el primer PA generado. Así, se observó, en ambos grupos de edad: una despolarización del potencial umbral, una disminución de la amplitud, una mayor duración media, y una disminución de las velocidades de despolarización y repolarización (Tablas R3-R5). Sin embargo, los parámetros del PA están más afectados al aumentar la frecuencia tetánica en ambos grupos de edad (Figuras R4 y R5), debido a una mayor inactivación de las corrientes implicadas en la generación del PA. Para cuantificar el efecto del tétanos sobre la morfología del PA en los dos intervalos de edad estudiados, se normalizaron los parámetros del PA generado en cada pulso con respecto de los parámetros del primer PA.

Tabla R3. Cambios en los parámetros del PA producidos por el disparo repetitivo a una frecuencia de 10 Hz.

Edad Orden PA (10 Hz)	9-12		P16-19	
	1º PA	10º PA	1º PA	10º PA
Amplitud (mV)	70,2 ± 2,0	62,5 ± 2,1 ***	84,2 ± 1,7	79,0 ± 2,4 **
Umbral de disparo (mV)	-52,6 ± 0,8	-51,1 ± 0,9 ***	-56,1 ± 2,7	-55,2 ± 2,6 **
Vel. despolarización (mV/ms)	144,5 ± 7,8	111,9 ± 6,0 ***	198,9 ± 6,1	168,3 ± 7,0 ***
Vel. repolarización (mV/ms)	-54,4 ± 2,1	-46,2 ± 1,9 ***	-47,0 ± 1,2	-39,8 ± 0,3 **
Duración media (ms)	1,17 ± 0,04	1,24 ± 0,04 **	1,44 ± 0,05	1,52 ± 0,03 *
Número de células	9	9	7	7

Se comparan los parámetros del primer PA generado con los del décimo PA.

1º PA vs 10º PA, * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001.

Tabla R4. Cambios en los parámetros del PA producidos por el disparo repetitivo a una frecuencia de 20 Hz.

Edad Orden PA (20 Hz)	9-12		P16-19	
	1º PA	10º PA	1º PA	10º PA
Amplitud (mV)	70,2 ± 2,0	62,4 ± 1,4 ***	83,8 ± 1,8	77,1 ± 2,8 **
Umbral de disparo (mV)	-53,3 ± 1,0	-51,4 ± 0,9 **	-56,4 ± 2,9	-54,7 ± 2,7 **
Vel. despolarización (mV/ms)	144,5 ± 7,3	107,5 ± 6,7 ***	197,8 ± 6,1	159,4 ± 8,3 ***
Vel. repolarización (mV/ms)	-54,6 ± 2,1	-40,5 ± 2,0 ***	-47,9 ± 1,5	-37,0 ± 0,9 ***
Duración media (ms)	1,17 ± 0,04	1,34 ± 0,04 ***	1,43 ± 0,04	1,55 ± 0,03 ***
Número de células	9	9	7	7

Se comparan los parámetros del primer PA generado con los del décimo PA.

1º PA vs 10º PA, * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001.

Tabla R5. Cambios en los parámetros del PA producidos por el disparo repetitivo a una frecuencia de 50 Hz.

Edad Orden PA (50 Hz)	9-12		P16-19	
	1º PA	10º PA	1º PA	10º PA
Amplitud (mV)	69,4 ± 2,2	64,3 ± 1,2 *	84,0 ± 1,9	72,8 ± 2,5 ***
Umbral de disparo (mV)	-53,4 ± 0,9	-49,7 ± 1,0 ***	-56,3 ± 2,9	-53,0 ± 2,4 **
Vel. despolarización (mV/ms)	144,6 ± 7,4	91,7 ± 7,4 ***	198,0 ± 5,9	144,1 ± 8,0 ***
Vel. repolarización (mV/ms)	-53,3 ± 2,1	-19,4 ± 2,6 ***	-49,0 ± 1,3	-31,2 ± 0,7 ***
Duración media (ms)	1,18 ± 0,04	2,52 ± 0,31 **	1,43 ± 0,05	1,78 ± 0,05 ***
Número de células	9	9	7	7

Se comparan los parámetros del primer PA generado con los del décimo PA

1º PA vs 10º PA, * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001.

Cuando se aplicó un tétanos de 10 Hz se observó:

- Un incremento de la duración media del PA y una disminución de la velocidad de repolarización durante el disparo repetitivo similares en ambos grupos de edad (Duración media: P=0,761; Repolarización: P=0,367, para el factor edad, Figura R4A). Con respecto del primer PA generado, el décimo PA tuvo una duración media un 6 % mayor, y la velocidad de repolarización fue un 15 % más lenta (Duración media del décimo PA: P9-12: 6,76 ± 1,74 % más ancho, P16-19: 6,00 ± 2,22 % más ancho, P=0,788; Repolarización: P9-12: 15,03 ± 2,23 % más lenta, P16-19: 15,14 ± 2,11 % más lenta, P=0,972).
- Una reducción de la amplitud mayor en el grupo P9-12 que en el grupo P16-19 (P<0,001 para el factor edad en ambos parámetros, Figura R5Aa). El décimo PA redujo su amplitud un 10,96 ± 0,95 % con respecto de la amplitud del primer PA en el grupo P9-12, mientras que en el grupo P16-19 la reducción de la amplitud fue de un 6,32 ± 1,25 % (P<0,01).
- Una disminución de la velocidad de despolarización mayor en el grupo P9-12 que en el grupo P16-19 (P<0,001 para el factor edad en ambos parámetros, Figura R5Ac). En el décimo PA, en comparación en primero, se redujo la velocidad de despolarización un 22,39 ± 1,94 % en el grupo P9-12, mientras que en el grupo P16-19 se redujo un 15,42 ± 1,89 % (P<0,05).

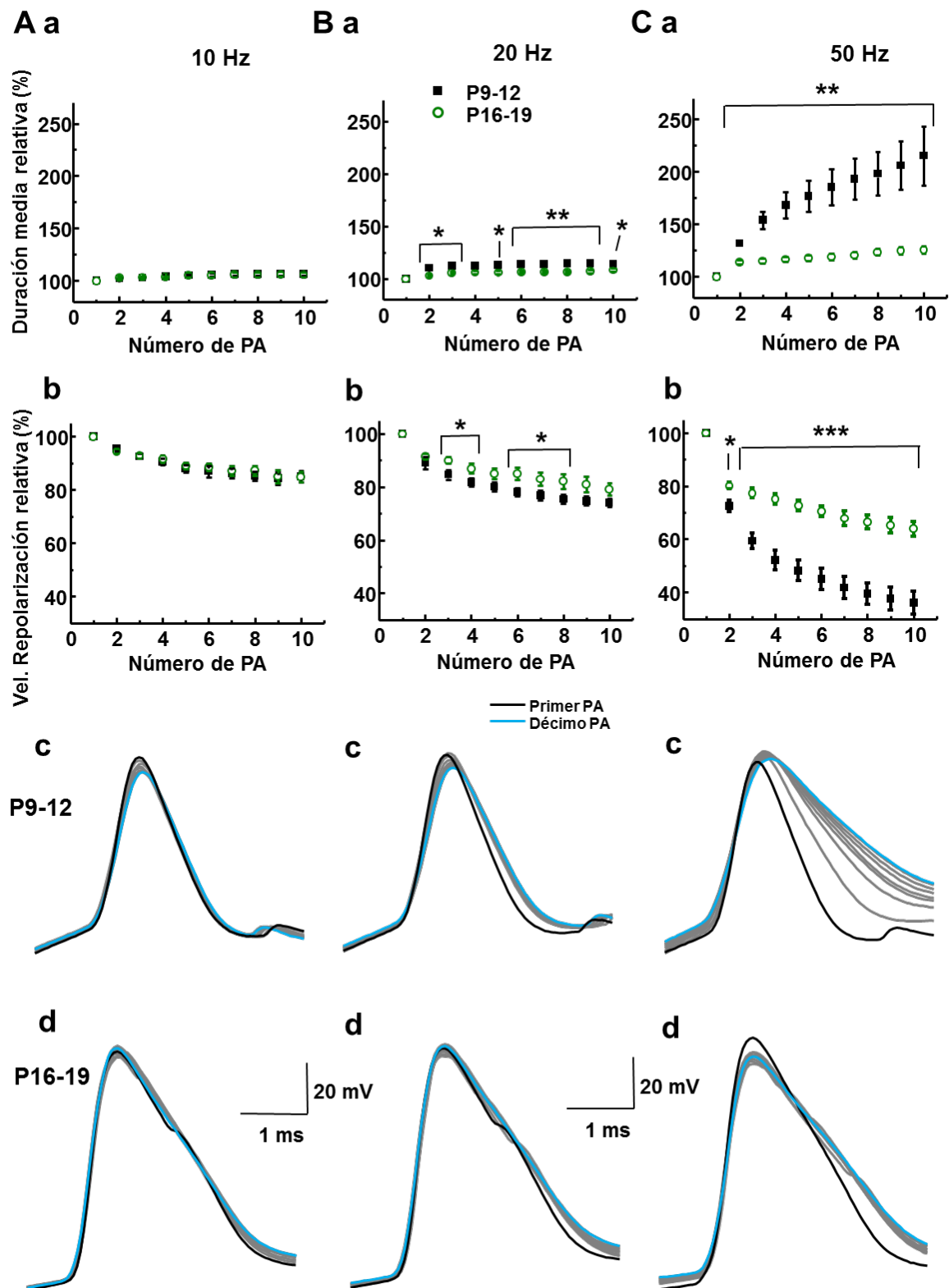


Figura R4: El tétanos produce un aumento en la duración del PA.

Representación de la duración media y de la velocidad de repolarización de cada PA generado mediante tétanos de 10 Hz (**A**), 20 Hz (**B**) y 50 Hz (**C**) siguiendo el protocolo descrito en la Figura R3, en los grupos de edad P9-12 (cuadrados negros, N=9 células) y P16-19 (círculos verdes, N=7 células). Se normalizó el valor de los parámetros de cada PA con respecto de los parámetros del primer PA de su serie. Se muestran ejemplos representativos de los PAs generados por un tétanos de cada frecuencia en el grupo P9-12 (**Aa**, **Ba** y **Ca**) y P16-19 (**Ad**, **Bd** y **Cd**), desde el primero (negro) hasta el décimo (azul), representando en gris los PAs intermedios.

- A)** Con un tétanos de 10 Hz se observa un incremento de la duración media (**Aa**) y una disminución en la velocidad de repolarización (**Ab**) durante el disparo repetitivo similar en ambos grupos de edad.
- B)** Con un tétanos de 20 Hz se observa, en ambos grupos de edad, un incremento de la duración media (**Ba**) y una disminución en la velocidad de repolarización (**Bb**) de mayor magnitud que los observados con el tétanos de 10 Hz. Además, se observa en el grupo 16-19, con respecto del grupo P9-12, un menor incremento de la duración media (**Ba**, estadísticamente significativa para todos los PAs, con excepción del cuarto PA) y una menor disminución de la velocidad de repolarización (**Bb**, estadísticamente significativa en los PAs 2, 3, 5, 6 y 7) durante el disparo repetitivo.
- C)** Con un tétanos de 50 Hz se observa, en ambos grupos de edad, un incremento de la duración media (**Ca**) y una disminución en la velocidad de repolarización (**Cb**) de mucha mayor magnitud que los observados con los tétanos de 10 Hz y 20 Hz. Además, se observa en el grupo 16-19, con respecto del grupo P9-12, un menor incremento de la duración media (**Ca**, estadísticamente significativa para todos los PAs) y una menor disminución de la velocidad de repolarización (**Cb**, estadísticamente significativa en todos los PAs) durante el disparo repetitivo.

Cada valor del parámetro normalizado en P9-12 vs P16-19, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Tras aplicar un tétanos de 20 Hz se observó:

- Un incremento de la duración media del PA durante el disparo repetitivo mayor en el grupo P9-12, con respecto del observado en el grupo P16-19 ($P < 0,001$ para el factor edad, Figura R4Ba). La duración media del décimo PA generado, en comparación con la del primero, fue un $14,27 \pm 1,48$ % mayor en el grupo P9-12, y un $8,41 \pm 1,41$ % mayor en el grupo P16-19 ($P < 0,05$).
- Una disminución de la velocidad de repolarización mayor en el grupo P9-12 que en el grupo P16-19 ($P < 0,001$ para el factor edad, Figura R4Bb). La velocidad de repolarización del décimo PA, con respecto de la del primero, fue un $25,00 \pm 1,53$ % más lenta en el grupo P-12, y un $20,78 \pm 2,41$ % más lenta en el grupo P16-19 ($P = 0,078$).
- Una mayor disminución de la amplitud del PA durante el disparo repetitivo en el grupo P9-12, con respecto de la observada en el grupo P16-19 ($P < 0,05$ para el factor edad, Figura R5Ba). Sin embargo, la magnitud de esta diferencia fue menor que la observada cuando la frecuencia de disparo fue de 10 Hz. Al aplicar la serie de pulsos con un tétanos de 20 Hz, el décimo PA redujo su amplitud un $10,82 \pm 1,39$ % con

respecto de la amplitud del primer PA en el grupo P9-12, mientras que en el grupo P16-19 la reducción de la amplitud fue de un $8,09 \pm 1,85$ % ($P=0,249$).

- Una mayor disminución de la velocidad de despolarización en el grupo P9-12 que en el grupo P16-19 ($P<0,001$ para el factor edad en ambos parámetros, Figura R5Bc), cuya magnitud fue similar a la observada con un tétanos de 10 Hz. Al aplicar la serie de pulsos con un tétanos de 20 Hz, la velocidad de despolarización del décimo PA se redujo un $25,79 \pm 2,04$ % con respecto de la velocidad de despolarización del primer PA en el grupo P9-12, mientras que en el grupo P16-19 se redujo un $19,58 \pm 2,57$ % ($P<0,05$).

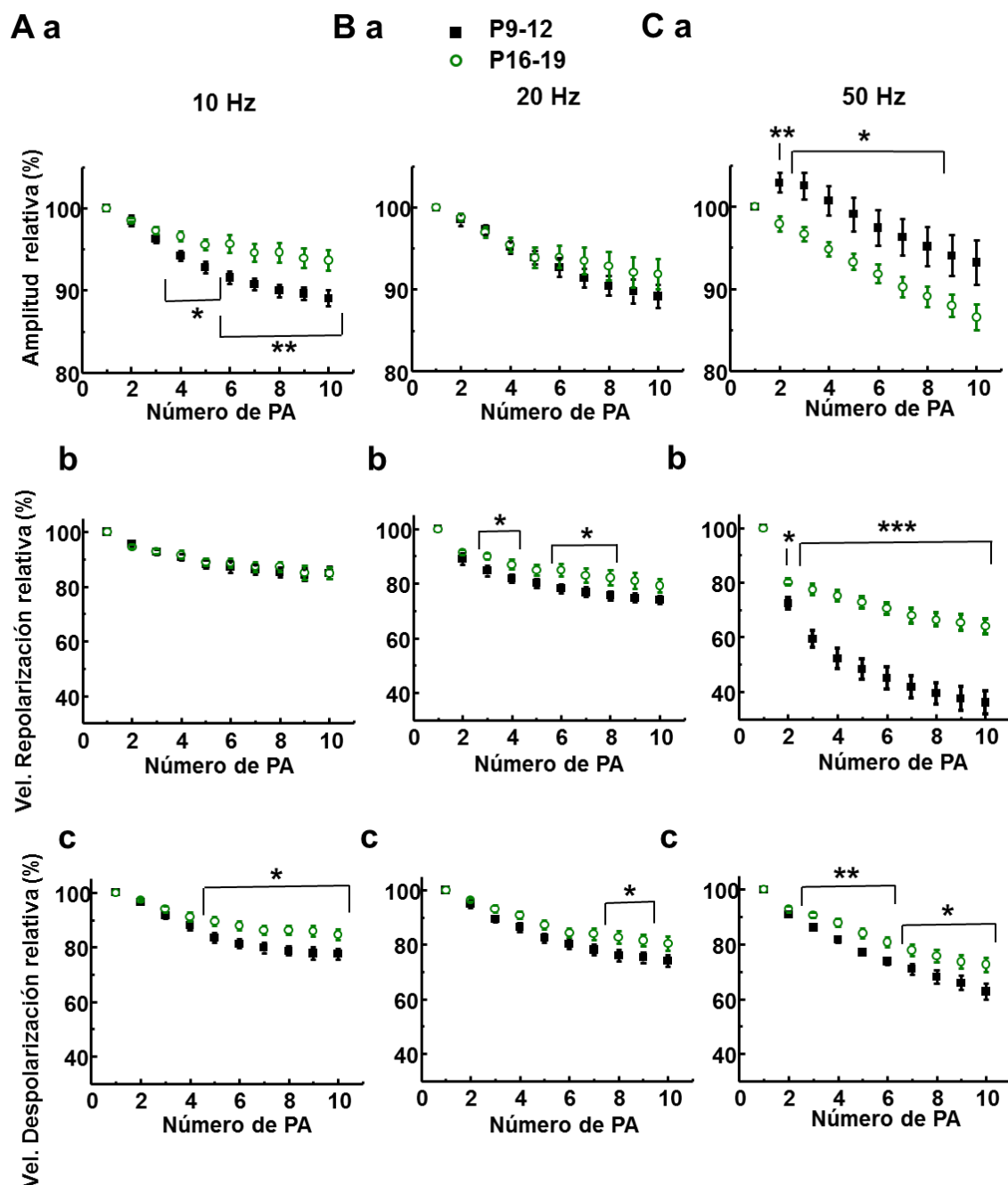


Figura R5: Efectos del tétanos sobre los parámetros del PA.

Representación de la amplitud y de las velocidades de repolarización y de despolarización de cada PA generado mediante tétanos de 10 Hz (**A**), 20 Hz (**B**) y 50 Hz (**C**) siguiendo el protocolo descrito en la Figura R3, en los grupos de edad P9-12 (cuadrados negros, N=9 células) y P16-19 (círculos verdes, N=7 células). Se normalizó el valor de los parámetros de cada PA con respecto de los parámetros del primer PA de su serie.

- A)** Con un tétanos de 10 Hz se observa en el grupo P16-19 una disminución de la amplitud menor (**Aa**, estadísticamente significativa desde el cuarto PA), con respecto de la disminución encontrada en el grupo P9-12. Como la disminución de la velocidad de repolarización durante el disparo repetitivo fue similar en ambos grupos de edad (**Ab**), la diferencia en la amplitud podría relacionarse con la disminución en la velocidad de despolarización menor que presenta el grupo P16-19, con respecto de la del grupo P9-12 (**Ac**, estadísticamente significativa a partir del quinto PA).
- B)** Con un tétanos de 20 Hz se observa en el grupo 16-19, con respecto del grupo P9-12, una menor disminución de la amplitud (**Ba**, $P < 0,05$ para el factor edad en una prueba ANOVA de dos factores, si bien en ninguno de los PAs de la serie se encontraron diferencias estadísticamente significativas), aunque la magnitud de esta diferencia fue menor que la que presenta con el tétanos de 10 Hz (**Aa**). También se observa en el grupo P16-19, con respecto del grupo P9-12, una menor disminución de la velocidad de repolarización (**Bb**, estadísticamente significativa en los PAs 2, 3, 5, 6 y 7) y de la velocidad de despolarización (**Bc**, estadísticamente significativas las diferencias en los PAs 8 y 9) durante el disparo repetitivo.
- C)** Con un tétanos de 50 Hz se observa en el grupo 16-19, con respecto del grupo P9-12, una disminución de la amplitud mayor (**Ca**, estadísticamente significativa en los PAs comprendidos desde el segundo hasta el octavo). Este efecto fue el contrario al observado con tétanos de 10 Hz (**Aa**) y 20 Hz (**Ba**), y podría estar relacionado con la disminución de la velocidad de repolarización mucho menor observada en el grupo P16-19 con respecto a la del grupo P9-12 (**Cb**, estadísticamente significativa en todos los PAs), ya que se observa en el grupo 16-19, con respecto del grupo P9-12, una menor disminución de la velocidad de despolarización (**Cc**, estadísticamente significativa en todos los PAs de la serie), siendo la magnitud de las diferencias similar a las observadas con tétanos de 10 Hz (**Ac**) y 20 Hz (**Bc**).

Cada valor del parámetro normalizado en P9-12 vs P16-19, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Por último, al aplicar un tétanos de 50 Hz se observó:

- Un aumento de la duración media del PA durante el disparo repetitivo mayor en el grupo P9-12, con respecto del observado en el grupo P16-19 ($P < 0,001$ para el factor edad, Figura R4Ca). La magnitud de esta diferencia fue mucho mayor que la observada al aplicar la serie de pulsos con un tétanos de 20 Hz. Con un tétanos de 50 Hz, la duración media aumentó en el grupo P9-12 de forma exponencial durante todo el tétanos ($R=0,982$, $\tau=4,02$ PAs), mientras que en el grupo P16-19 se produjo el mayor cambio entre el primer y el segundo PA, y a partir del segundo los cambios se produjeron de forma lineal con una pendiente lenta (Duración media: $R=0,996$, $m=1,56$ %/PA). La duración media del décimo PA generado, en comparación con la

del primero, fue un $115,27 \pm 27,98$ % mayor en el grupo P9-12, y un $25,44 \pm 3,65$ % mayor en el grupo P16-19 ($P < 0,05$).

- Una reducción de la velocidad de repolarización durante el disparo repetitivo mayor en el grupo P9-12, con respecto de la observada en el grupo P16-19 ($P < 0,001$ para el factor edad, Figura R4Cb). La magnitud de esta diferencia fue mucho mayor que la observada al aplicar un tétanos de 20 Hz. Con un tétanos de 50 Hz, la velocidad de repolarización disminuyó en el grupo P9-12 de forma exponencial durante todo el tétanos ($R=0,971$, $\tau=2,14$ PAs), mientras que en el grupo P16-19 se produjo el mayor cambio entre el primer y el segundo PA, y a partir del segundo los cambios se produjeron de forma lineal con una pendiente lenta (Duración media: $R=0,991$, $m=-2,05$ %/PA). El décimo PA tuvo una velocidad de repolarización un $63,97 \pm 4,0$ % más lenta que la del primer PA en el grupo P-12, y un $35,98 \pm 2,76$ % más lenta en el grupo P16-19 ($P < 0,001$).
- Una disminución de la velocidad de despolarización mayor en el grupo P9-12 que en el grupo P16-19 ($P < 0,001$ para el factor edad, Figura R5Cc). La magnitud de esta diferencia fue similar a la observada con tétanos de 10 Hz y 20 Hz. Con tétanos de 50 Hz, la velocidad de despolarización del décimo PA inducido se redujo un $37,29 \pm 2,94$ % en el grupo P9-12 con respecto de la velocidad de despolarización del primer PA, mientras que en el grupo P16-19 se redujo un $27,43 \pm 2,53$ % ($P < 0,05$).
- Una menor disminución de la amplitud del PA con el tétanos en el grupo P9-12 que en el grupo P16-19 ($P < 0,001$ para el factor edad, Figura R5Ca). Incluso en los PAs que sucedían al primer PA generado en el grupo P9-12, la amplitud se vio aumentada en vez de disminuida (Figura R5Ca, Figura R6). Esta diferencia es de sentido opuesto a la observada con frecuencias de 10 Hz y 20 Hz. Con tétanos de 50 Hz, la amplitud del décimo PA generado, con respecto de la del primero, fue un $6,79 \pm 2,69$ % menor en el grupo P9-12, mientras que en el grupo P16-19 fue un $13,44 \pm 1,62$ % menor ($P=0,069$).

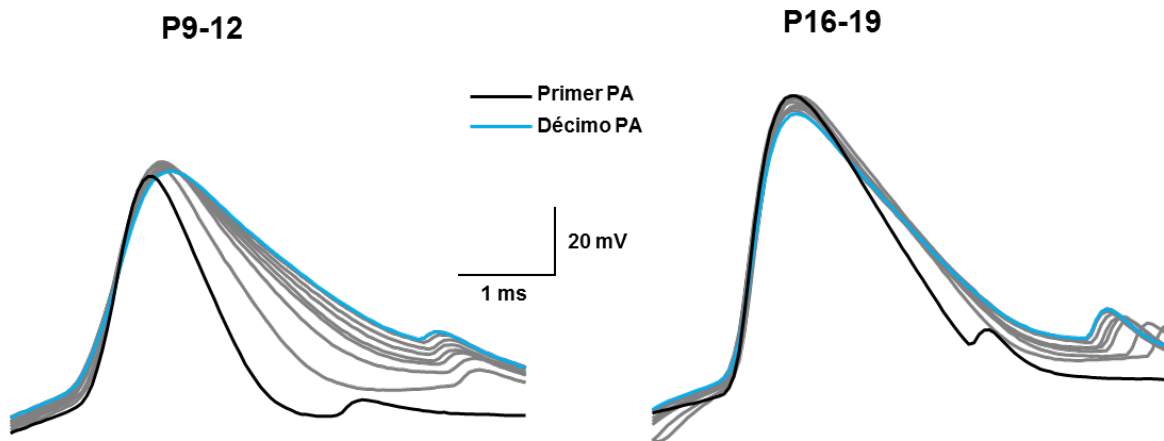


Figura R6. El disparo repetitivo de alta frecuencia afecta de modo diferente a la morfología del PA durante el desarrollo.

Registros representativos comparando la evolución de la morfología del PA generado por cada pulso de una serie de diez a una frecuencia de 50 Hz (siguiendo el protocolo descrito en la Figura R3), en los grupos de edad P9-12 (izquierda) y P16-19 (derecha).

El primer PA inducido está representado en negro, el décimo PA está representado en azul, y todos los demás PAs intermedios se representaron en gris.

Se puede observar cómo el incremento de la duración por el disparo repetitivo es mucho mayor y más gradual en el grupo P9-12, con respecto de que ocurre en el grupo P16-19. Además se puede apreciar que tras el primer PA generado, la amplitud aumenta en el grupo. Sin embargo, la amplitud del PA va disminuyendo progresivamente desde el segundo PA disparado hasta el décimo, en grupo P16-19.

Los resultados descritos sobre el efecto que tiene el tétanos sobre la morfología de los PAs se pueden resumir en:

- El tétanos tiene los siguientes efectos en ambos grupos de edad: disminuye las velocidades de despolarización y repolarización, aumenta la duración media y disminuye la amplitud del PA generado y despolariza el umbral
- Los efectos descritos aumentan su magnitud conforme aumenta la frecuencia de disparo de los PAs.
- Con un tétanos de 10 Hz se observa una mayor reducción de la velocidad de despolarización y de la amplitud de los PAs generados en el grupo P9-12, con respecto de la observada en los generados en el grupo P16-19. Sin embargo, con esta frecuencia

de disparo, la disminución de la velocidad de repolarización y el aumento de la duración media fue similar en ambos grupos de edad.

- A partir de tétanos de 20 Hz, el aumento de la duración media y la reducción de la velocidad de repolarización observados a dicha frecuencia son mayores en el grupo P9-12 que en el grupo P16-19. Estas diferencias entre los dos grupos de edad se ven muy incrementadas con tétanos de 50 Hz.
- Con un tétanos de 10 Hz, la reducción de la amplitud es mayor en el grupo P9-12 que en el P16-19. Sin embargo, la reducción de la amplitud con un tétanos de 50 Hz es menor en el grupo P9-12 que en el P16-19 (incluso en el grupo P9-12, la amplitud aumenta en los PAs que siguen al primero).

1.4. Evolución de la excitabilidad en el desarrollo postnatal.

Las neuronas convierten las aferencias que reciben de sinapsis excitadoras e inhibitoras en una señal de salida cuya información está codificada por la frecuencia y el patrón de disparo de los PAs (Beck & Yaari 2008). En este acoplamiento entre la entrada y la salida de información tiene un papel crucial la excitabilidad intrínseca de la neurona, que está determinada por las propiedades y distribución de los canales iónicos de la membrana plasmática (Daoudal & Debanne 2003). Como ya se mostró anteriormente, tanto los canales como la morfología neuronal se modifica durante las primeras semanas postnatales, provocando cambios en las propiedades pasivas de la membrana (el potencial de reposo, la resistencia, la capacidad y la constante de tiempo) y en las propiedades activas (la morfología del PA y el ensanchamiento de los mismos durante un tétanos). Por tanto, sería esperable que pudiera cambiar la capacidad de respuesta de la neurona ante un mismo estímulo a medida que avanza el desarrollo.

Con el fin de estudiar la evolución de la excitabilidad en las neuronas piramidales de CA1 durante el desarrollo, se realizaron registros de *patch-clamp* en fijación de corriente con la membrana fijada a -80 mV. En una primera serie de experimentos, se aplicaron pulsos de corriente despolarizante, de 1 segundo de duración e intensidad creciente (intensidades de corriente entre un mínimo de 10 pA y un máximo de 550 pA, con incremento de corriente de 10 pA, Figura R7). A fin de explorar la excitabilidad neuronal se construyó una curva de entrada-salida en la que se representa la frecuencia de disparo de los PAs frente a la intensidad de corriente aplicada. La representación de la curva de entrada-salida muestra diferencias en la frecuencia de los PAs disparados en los dos grupos de edad ($P < 0,001$ para el factor edad). Ante estímulos de igual intensidad de corriente, para intensidades de corriente baja, las neuronas del grupo P9-12 dispararon un número de PAs mayor que el grupo P16-19. Por el contrario, para intensidades de corriente más alta, las neuronas del grupo P9-12 dispararon menor número de PAs que el grupo P16-19. Además, las neuronas del grupo P9-12 alcanzaron la frecuencia máxima de disparo a una intensidad de corriente menor que las neuronas del grupo P16 (Figura R8).

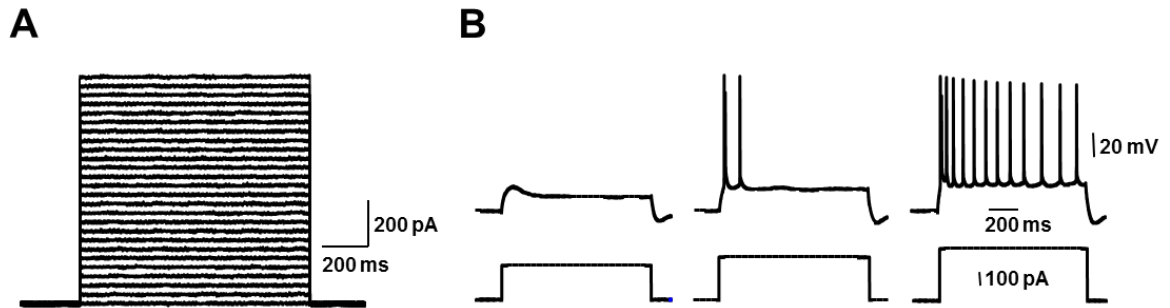


Figura R7. Protocolo utilizado para evaluar la excitabilidad neuronal.

A) Protocolo para evaluar la excitabilidad neuronal. Se estudió la respuesta de la neurona a la inyección intrasomática de pulsos cuadrados de corriente despolarizante, de 1 segundo de duración y de intensidad creciente.

B) Registros representativos de los PAs generados en respuesta a pulsos de corriente 240, 300 y 360 pA de intensidad. Se puede observar cómo la frecuencia de disparo de PAs varía con la intensidad del pulso.

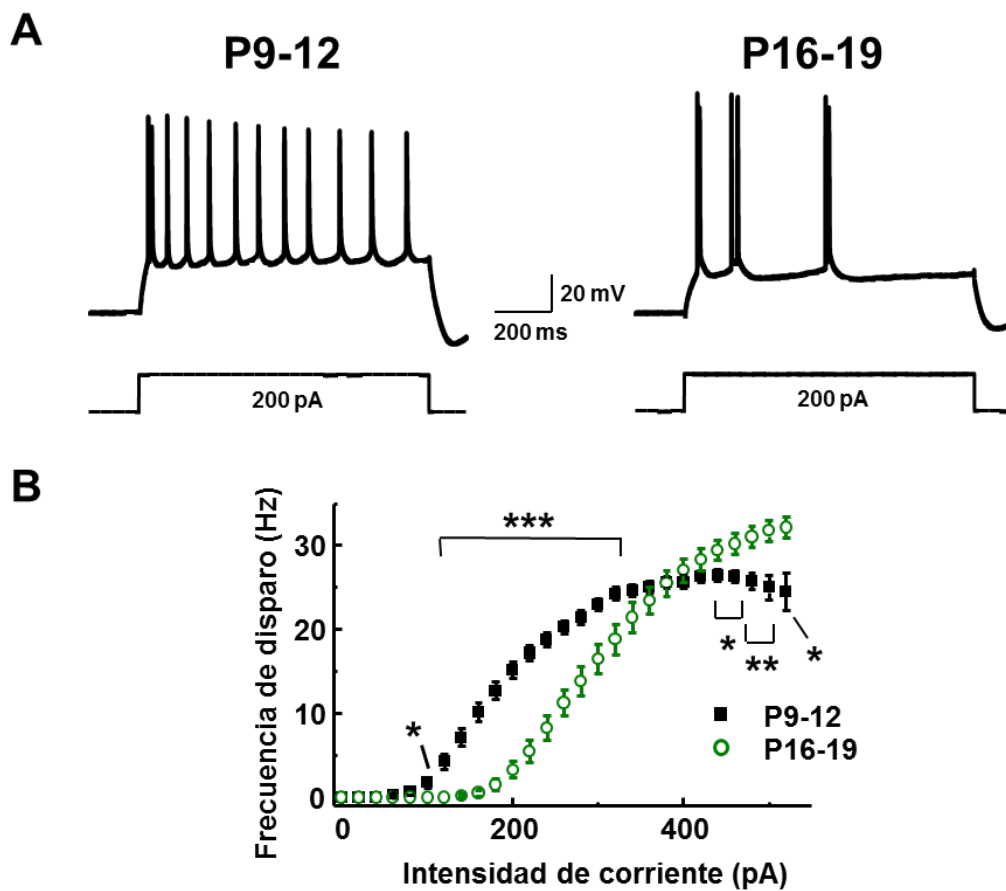


Figura R8. La excitabilidad neuronal a lo largo del desarrollo postnatal disminuye por las propiedades pasivas de la membrana.

- A)** Registros representativos de los PAs generados en respuesta a pulsos de 1 segundo de duración y 200 pA de intensidad.
- B)** Curva de entrada-salida que relaciona la frecuencia de disparo de los PAs promedio frente a la intensidad de corriente inyectada.

Se aprecia cómo en respuesta a la inyección de 100 a 320 pA de corriente, las neuronas del grupo P9-12 (cuadrados negros, N=27) disparan más PAs que las del grupo P16-19 (círculos verdes, N=18). También se observa cómo las neuronas del grupo P9-12 alcanzan su frecuencia máxima de disparo con pulsos de corriente de menor intensidad. Además, con pulsos de corriente de intensidad igual o superior a 420 pA, la frecuencia de disparo en el grupo P9-12 es inferior a la que presentan las neuronas del grupo P16-19.

P9-12 vs P16-19, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001.

La mayor excitabilidad encontrada en las neuronas procedentes de ratas más jóvenes ante estímulos de intensidad baja podría estar relacionada con los cambios producidos durante el desarrollo en las propiedades pasivas de la membrana. De acuerdo con la ley de Ohm ($V = I \cdot R$), la mayor resistencia de la membrana de las neuronas de los animales más inmaduros (Tabla R1), produce una mayor despolarización de la membrana para estímulos de igual intensidad, reflejándose en un aumento en la frecuencia de disparo.

Con el objetivo de analizar la evolución de la excitabilidad neuronal en función de sus propiedades activas, se realizó una nueva gráfica de entrada-salida. En ella se representó la frecuencia de disparo de los PAs frente al potencial de estabilización teórico, el cual alcanzaría la membrana en cada pulso de corriente despolarizante según la ley de Ohm, eliminando las diferencias debidas a la resistencia de la membrana. En esta nueva gráfica se puede apreciar cómo en respuesta a estímulos que despolarizaron la membrana a un mismo potencial teórico, la frecuencia de descarga de los PAs fue menor en el grupo P9-12, con respecto a la observada en el grupo P16-19 ($P < 0,001$ para el factor edad, Figura R9).

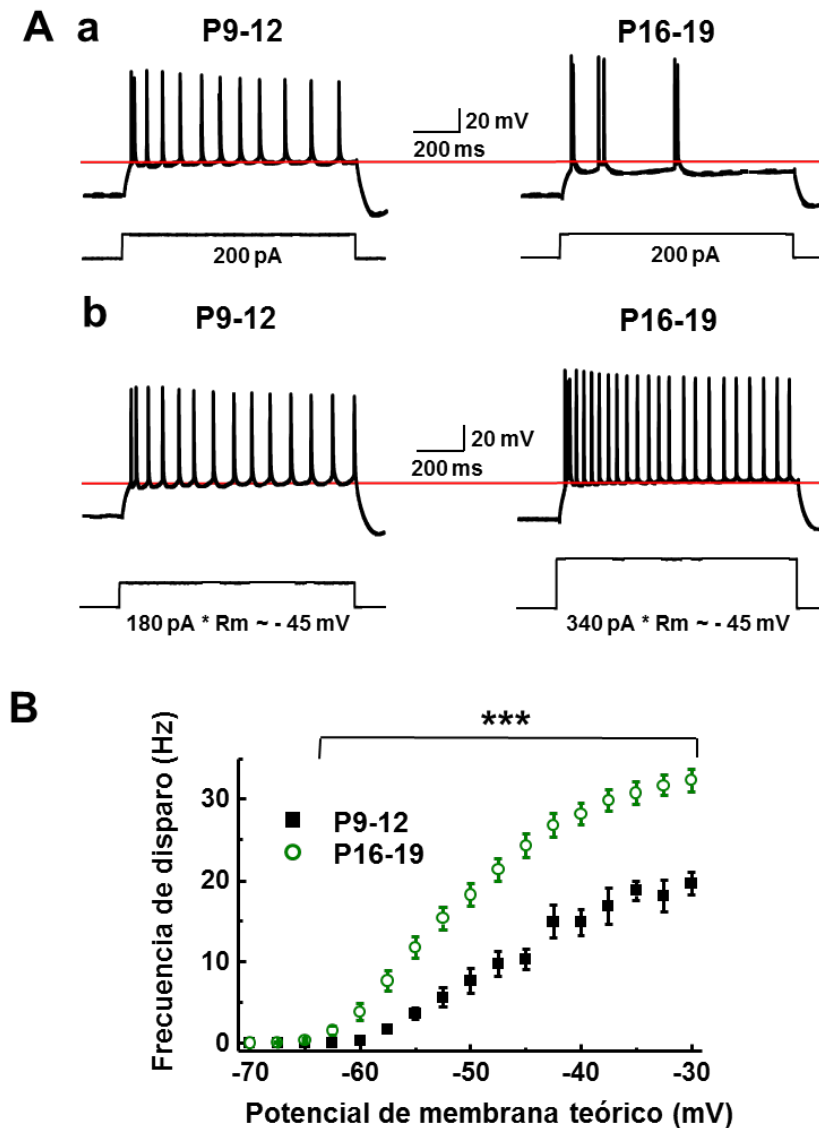


Figura R9. La excitabilidad neuronal aumenta durante el desarrollo postnatal.

Con el objetivo de analizar la evolución de la excitabilidad neuronal durante el desarrollo en función de las propiedades activas de la membrana, se eliminaron las diferencias debidas a la resistencia de la membrana. Para ello se representó la frecuencia de disparo de los PAs, generados en los grupos P9-12 y P16-19, frente al potencial de estabilización teórico que alcanzaría la membrana para cada pulso de corriente, según la ley de Ohm.

A) Registros representativos de los PAs generados por pulsos cuadrados de 1 s de duración en los grupos P9-12 (izquierda) y P16-19 (derecha). La línea roja muestra el voltaje de estabilización en el grupo P9-12. Se puede observar cómo en respuesta a pulsos de igual intensidad (**Aa**, en el ejemplo, 200 pA), las neuronas del grupo P9-12 disparan más PAs que las neuronas del grupo P16-19, debido a que la despolarización producida por el pulso es mayor que la del grupo P16-19. Sin embargo, en respuesta a pulsos que generan una despolarización de igual magnitud (**Ab**, en el ejemplo alcanzan un potencial teórico de -45 mV), la frecuencia de disparo de PAs de las neuronas del grupo P9-12 es menor que la de las neuronas del grupo P16-19.

B) Curva de entrada-salida que relaciona la frecuencia de disparo de los PAs promedio frente al potencial teórico que alcanza la membrana. Se puede apreciar cómo ante pulsos que generan una despolarización de la misma magnitud, las neuronas del grupo P9-12 (negro, N=27) disparan menos PAs que las del grupo P16-19 (verde, N=18).

P9-12 vs P16-19, *** $P < 0,001$.

Además cabe destacar un incremento estadísticamente significativo en la frecuencia máxima de disparo que es capaz de generar la neurona, observado a medida que avanza el desarrollo postnatal ($P < 0,001$, Figura R10). Este incremento de la frecuencia máxima se puede apreciar también en la Figura R8.

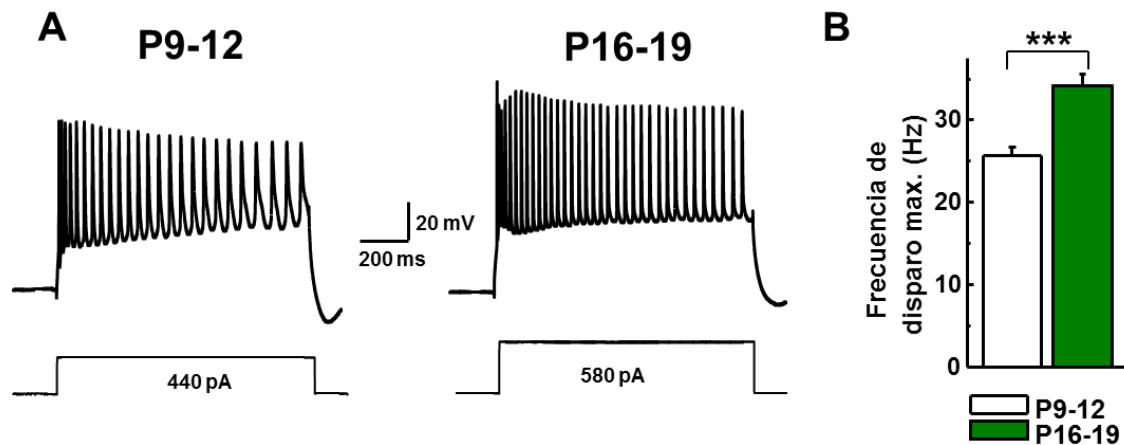


Figura R10. La frecuencia máxima de disparo aumenta durante el desarrollo postnatal.

A) Registros representativos de PAs generados por pulsos de 1 s de duración a intensidad suficiente para que la frecuencia de disparo de los mismos fuera la máxima, en neuronas del grupo P9-12 (izquierda) y P16-19 (derecha).

B) Gráfico de barras que representa la frecuencia máxima de disparo de los PAs en los grupos P9-12 (blanco, N=27) y P16-19 (verde, N=18). Se puede observar cómo la frecuencia máxima de disparo aumenta con el avance del desarrollo postnatal.

P9-12 vs P16-19, *** $P < 0,001$.

2. Una nueva plasticidad de la excitabilidad intrínseca a corto plazo en las neuronas piramidales de CA1 del hipocampo.

2.1. El potencial de la membrana afecta a las propiedades pasivas de la membrana neuronal.

El potencial de la membrana de una neurona determina la situación cinética de los canales dependientes de voltaje que se encuentran en la membrana, influyendo en sus propiedades pasivas (Connors et al. 1982; Biscoe & Duchen 1985; McCormick et al. 1985; Lüthi & McCormick 1998; Delmas & Brown 2005). Con el fin de estudiar la influencia que el potencial de la membrana tiene sobre la excitabilidad intrínseca en las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo de rata, en primer lugar se analizaron sus propiedades electrofisiológicas básicas de la membrana. Para ello se realizaron registros de *patch-clamp* en fijación de corriente en neuronas piramidales de CA1 de ratas pertenecientes a dos intervalos de edad (un grupo P9-12, formado por ratas de entre 9 y 12 días, y otro P16-19, formado por ratas de entre 16 y 19 días) y a dos potenciales de fijación: manteniendo el potencial de la membrana en -80 mV (situación control), y tras despolarizar la membrana hasta un potencial subumbral próximo a -60 mV. En este contexto se estudiaron la resistencia, la capacidad y la constante de tiempo de la membrana plasmática a ambos potenciales de fijación en función de su respuesta a la inyección intrasomática de corriente mediante pulsos cuadrados con una intensidad de corriente de -20 pA y una duración de 300 ms.

Tabla R6. Influencia del potencial de fijación sobre las propiedades pasivas en neuronas piramidales de CA1.

Potencial	P9-12		P16-19	
Edad	-80 mV	-60 mV	-80 mV	-60 mV
Vm reposo (mV)	-70,3 ± 0,3	-70,3 ± 0,3	-72,1 ± 0,2	-72,1 ± 0,2
Resistencia de la membrana (MΩ)	189,5 ± 6,3	379,9 ± 11,2***	94,2 ± 1,4	209,0 ± 3,9***
Capacidad de la membrana (pF)	129,9 ± 3,0	133,1 ± 3,0***	212,4 ± 3,5	206,2 ± 3,9***
Constante de tiempo (ms)	23,3 ± 0,5	48,8 ± 1,2***	19,7 ± 0,4	41,8 ± 0,8***
Número de células	100	100	188	188

-80 mV vs -60 mV, *** P < 0,001.

En ambos grupos de edad las neuronas piramidales de CA1 presentaron una resistencia y una constante de tiempo de la membrana estadísticamente mayores al fijar la membrana a -60 mV con respecto de cuando se fijó a -80 mV (Tabla R6, Figura R11, P<0,001 para ambos parámetros). Además, en ambos grupos de edad se observó una capacidad de la membrana similar en los dos potenciales estudiados (Tabla R6, P9-12: P=0,074; P16-19: P=0,123).

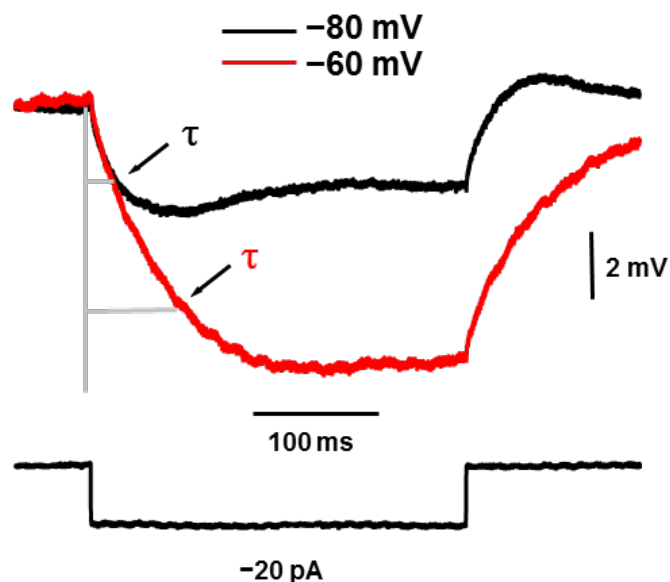


Figura R11. La despolarización del potencial de la membrana provoca un aumento en la resistencia y en la constante de tiempo de la membrana.

Registros representativos obtenidos tras inyectar un pulso de corriente negativa de 20 pA de intensidad a dos potenciales de la membrana: -80 mV (negro) y -60 mV (rojo).

Se puede observar cómo, tras la inyección de la corriente, la amplitud del cambio del voltaje y la constante de tiempo de la membrana aumentan tras fijar la membrana a -60 mV, con respecto a cuando se fija a -80 mV.

2.2. El potencial de la membrana afecta a la morfología de los potenciales de acción.

2.2.1. Efecto de la duración del pulso o rampa despolarizante previa a la inducción del potencial de acción sobre su morfología.

Los experimentos realizados por Lapicque estimulando el nervio ciático de ranas, demostraron que el voltaje necesario para contraer el músculo gastrocnemio era menor cuanto mayor era la duración del estímulo (Lapicque 1907). Trabajos posteriores profundizaron en esta relación intensidad-duración del estímulo con el fin de estudiar las condiciones umbrales para la generación de PAs (Noble & Stein 1966; Bostock 1983; Fricker et al. 1999). En la Figura R12 se muestra un ejemplo de cómo se puede generar un PA con un pulso de corriente corto y de alta intensidad (el cual produce una despolarización rápida hasta alcanzar el umbral de voltaje para el disparo del PA), o con un pulso de menor intensidad pero mayor duración (en el que la despolarización es más lenta y el tiempo necesario para alcanzar el umbral de disparo del PA es mayor).

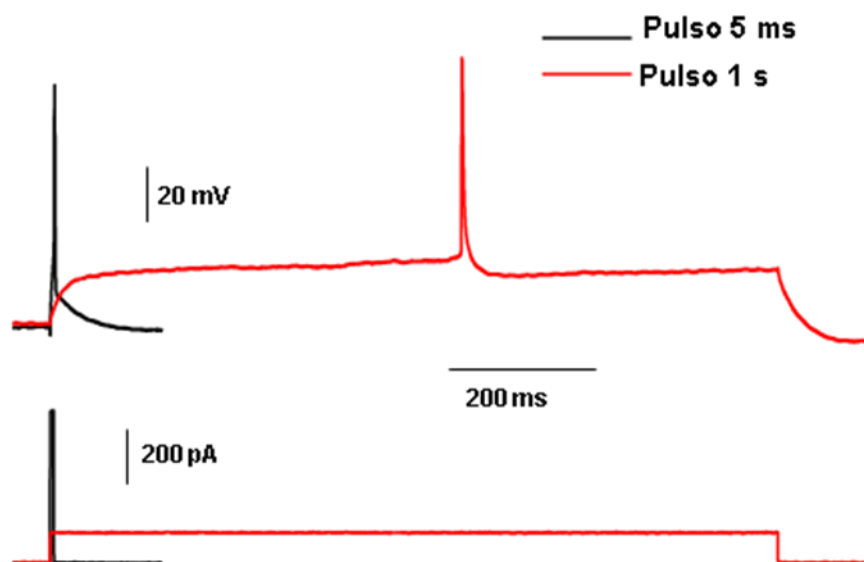


Figura R12. Pulsos de corriente de distinta intensidad y duración pueden alcanzar el umbral de disparo del PA.

Ejemplo que ilustra cómo el PA se puede generar mediante un pulso de corriente corto y de alta intensidad (trazo negro, 5 ms de duración y 560 pA de intensidad de corriente) o mediante un pulso de menor intensidad de corriente pero mayor duración (trazo rojo, 1 s de duración y 100 pA de intensidad).

La visión clásica sobre cómo afecta la despolarización del potencial de la membrana a los canales dependientes de voltaje que se activan a potenciales subumbrales plantea que éstos pueden sufrir una inactivación dependiente del tiempo que permanece despolarizada la membrana. En consecuencia, esta inactivación de canales debería afectar a la morfología de los PAs, disminuyendo sus velocidades de despolarización y repolarización, y por tanto, ensanchando los PAs (Bossu et al. 1996; Fricker et al. 1999; Mitterdorfer & Bean 2002; Axmacher & Miles 2004; Shu et al. 2006; Shu et al. 2007b; Gong et al. 2008).

Con el objetivo de estudiar el efecto de la duración de la despolarización del potencial de la membrana en reposo sobre la morfología del potencial del PA de las neuronas piramidales de CA1, se realizaron registros de *patch-clamp* en fijación de corriente en neuronas procedentes de dos grupos de edad (entre los 9 y 12 días, y entre los 16 y 19 días de edad). En ellos se generaron PAs mediante dos protocolos distintos tras fijar el potencial de la membrana en -80 mV (Figura R13A):

- Un pulso cuadrado de corriente despolarizante, con una duración breve (5 milisegundos) y alta intensidad, que permitió alcanzar el umbral de voltaje para el disparo de un PA a los pocos milisegundos del inicio del pulso.
- Una rampa de corriente despolarizante, de mayor duración (1 segundo) y de menor intensidad. Con este protocolo el umbral de voltaje para el disparo del PA se produjo cuando la duración de la despolarización fue próxima a 1 segundo.

En ambos protocolos se aplicó una intensidad de corriente umbral. Puesto que la inactivación de los canales es dependiente del tiempo de despolarización, deberían inactivarse más canales al despolarizar la membrana mediante el protocolo de rampa de 1 segundo de duración, en comparación con la inactivación esperada cuando se aplicó un pulso cuadrado despolarizante de mayor intensidad y de sólo 5 ms, y en consecuencia, que el primer PA generado mediante el protocolo de rampa de 1 segundo fuera de mayor duración. El análisis de los PAs generados con ambos protocolos confirmó lo esperado: el PA generado por la rampa de corriente despolarizante tuvo una duración media estadísticamente mayor que el generado mediante el protocolo de pulso cuadrado de 5 ms en ambos grupos de edad (Figura R13B, Tabla R7; P9-12: $67,54 \pm 8,99$ % más anchos; P16-19: $11,03 \pm 1,34$ % más anchos, $P < 0,001$ en ambas edades).

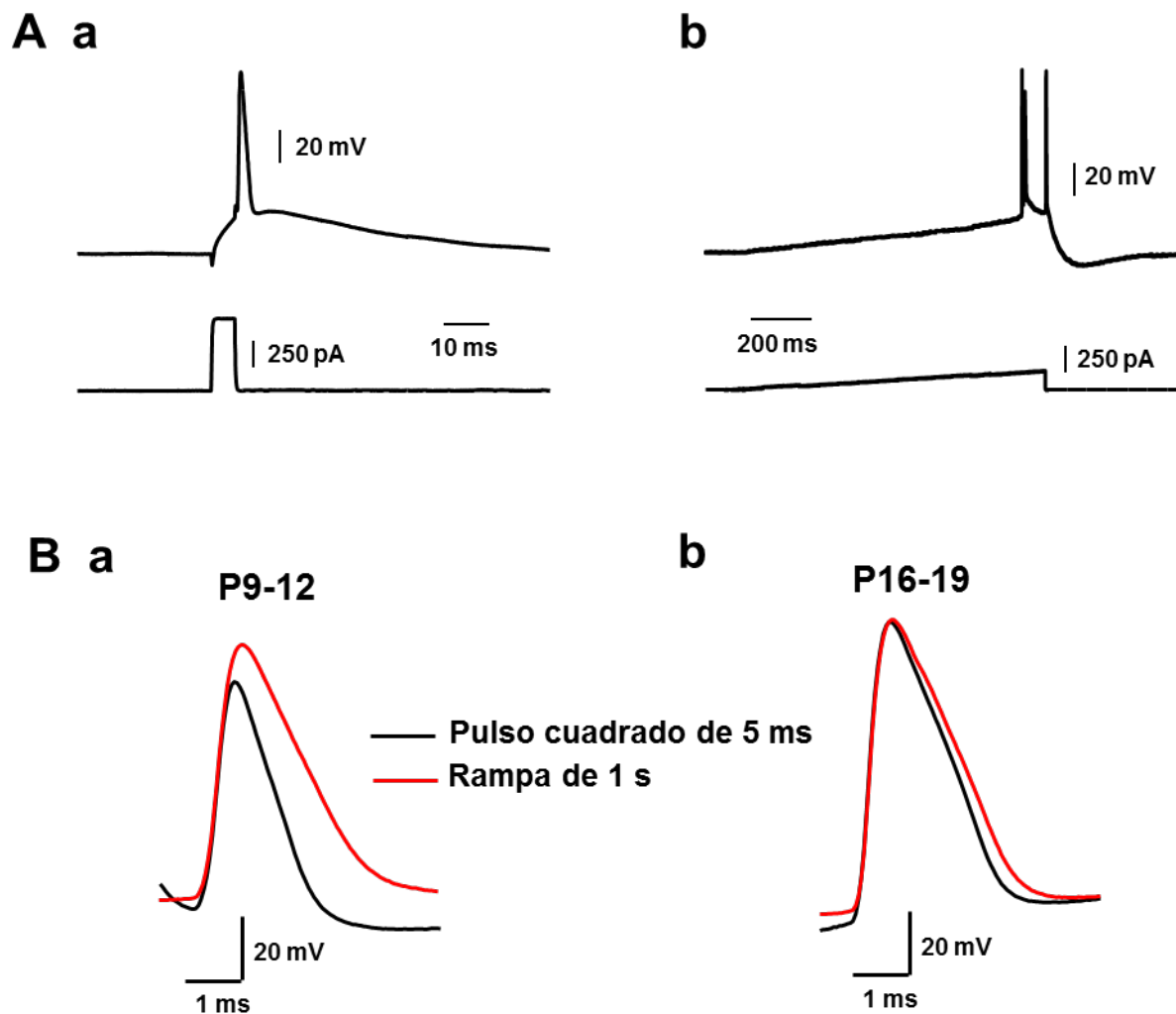


Figura R13. Efecto de la duración de la despolarización del potencial de la membrana sobre la morfología del PA.

- A)** Protocolos empleados para la generación de los PAs. Se aplicaron pulsos cuadrados de corriente con una duración de 5 ms a una intensidad umbral (**Aa**), y rampas de corriente de 1 s de duración a una intensidad umbral (**Ab**).
- B)** Registros representativos del primer PA generado tras aplicar un pulso cuadrado de 5 ms (trazo negro) o una rampa de 1 s de duración (trazo rojo) en neuronas procedentes de ratas de los grupos P9-12 (**Ba**) y P16-19 (**Bb**). Se aprecia cómo en ambos grupos de edad el PA tiene mayor duración cuando se genera mediante el protocolo de rampa, en el cual el tiempo de despolarización hasta alcanzar el umbral de disparo del PA es más prolongado.

Tabla R7. La duración de la despolarización afecta a la morfología del PAs de las neuronas piramidales de CA1.

Edad Grupo	P9-12		P16-19	
	Pulso de 5 ms	Rampa de 1 s	Pulso de 5 ms	Rampa de 1 s
Amplitud (mV)	70,3 ± 1,7	78,9 ± 1,1 ***	87,3 ± 1,5	87,5 ± 1,0
Umbral de disparo (mV)	-53,6 ± 0,7	-53,6 ± 0,9	-59,9 ± 0,7	-58,7 ± 0,4 **
Vel. despolarización (mV/ms)	144,4 ± 6,1	141,3 ± 5,5	199,8 ± 7,5	191,8 ± 5,5 *
Vel. repolarización (mV/ms)	-48,4 ± 1,9	-29,8 ± 1,5 ***	-40,4 ± 0,9	-37,1 ± 0,9 ***
Duración media (ms)	1,24 ± 0,04	2,06 ± 0,1 ***	1,56 ± 0,02	1,73 ± 0,03 ***
Número de células	16	16	14	14

Pulso cuadrado de 5 ms vs rampa de 1 s, * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

Para apreciar de forma más clara las diferencias en la morfología de los PAs generados, se realizaron diagramas de fase que relacionan la velocidad de cambio de voltaje durante la evolución del PA (primera derivada del PA, mV/ms) con respecto al potencial de la membrana que presenta el PA en dicho instante. Mediante dicha representación (Figura R14) se puede observar cómo:

- La fase de despolarización del PA generado mediante ambos protocolos fue similar en el grupo P9-12. En el grupo P16-19 fue más lenta cuando el PA se generó por la rampa despolarizante de 1 segundo.
- La fase de la repolarización disminuyó en ambos grupos de edad cuando el PA fue generado mediante el protocolo de rampa despolarizante con respecto al generado por el pulso cuadrado de menor duración y mayor intensidad.
- La amplitud del PA generado mediante el protocolo de rampa despolarizante fue mayor que la del generado mediante el pulso cuadrado de 5 ms en las neuronas del grupo P9-12. En las neuronas registradas del grupo P16-19, la amplitud del PA generado por ambos protocolos fue similar.

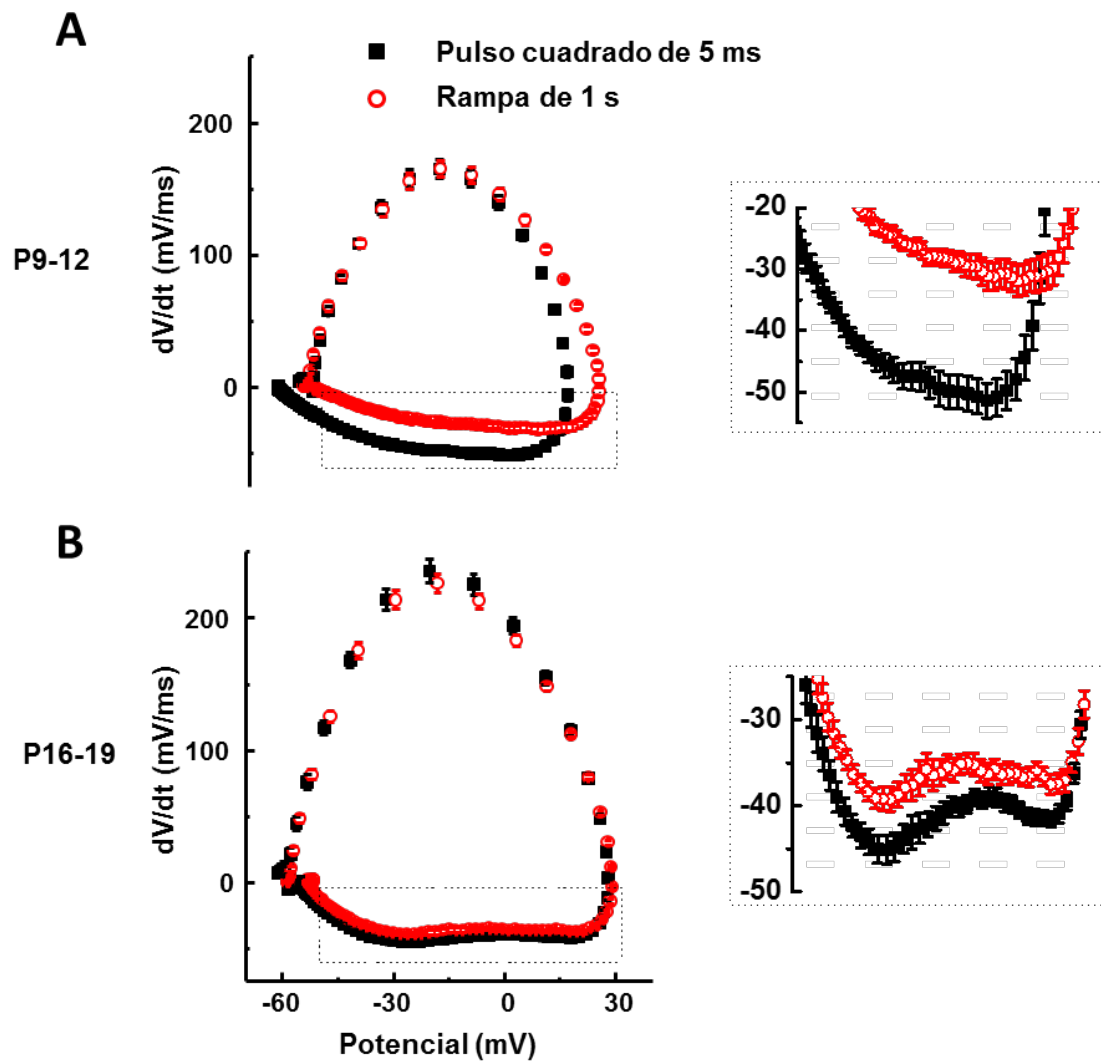


Figura R14. Efecto de la duración de la despolarización del potencial de la membrana sobre los diagramas de fase de los PAs.

Diagramas de fase promedio de los PAs generados mediante un pulso cuadrado de 5 ms de duración (cuadrados negros) o una rampa despolarizante de 1 s de duración (círculos rojos), en los grupos P9-12 (A) y P16-19 (B). En ambos protocolos se empleó una intensidad de corriente umbral.

- A)** En el grupo P9-12 se observa cómo el PA generado mediante el protocolo de rampa despolarizante tiene la fase de repolarización más lenta y una mayor amplitud, comparado con el PA generado con el pulso cuadrado de 5 ms. N=16 células.
- B)** En el grupo P16-19 se observa cómo las fases de despolarización y repolarización son más lentas en el PA generado mediante el protocolo de rampa despolarizante con respecto al PA generado con el pulso cuadrado de 5 ms. N=14 células.

2.2.2. La despolarización sostenida genera una plasticidad a corto plazo en el potencial de acción.

Muchas neuronas reciben continuos estímulos sinápticos que incrementan su conductancia de la membrana (Brickley et al. 2001). En respuesta a estas perturbaciones, las neuronas pueden modificar las propiedades de la membrana para estabilizar su actividad (Nelson & Turrigiano 2008; Brown & Randall 2009). En los últimos años, diversos grupos han descrito cambios en la excitabilidad neuronal debidos a un incremento en corrientes de potasio y/o una disminución en corrientes de calcio como respuesta al aumento de la actividad neuronal inducido por despolarizaciones sostenidas (Franklin et al. 1992; Moulder et al. 2003; O'Leary et al. 2010; Tong et al. 2010) o mediante estimulación sináptica (Fan et al. 2005; Campanac & Debanne 2008; Brown & Randall 2009; Jung & Hoffman 2009).

En el presente apartado se estudió el efecto de la despolarización subumbral sostenida sobre la morfología de los PAs registrados en las neuronas piramidales de CA1 mediante experimentos de *patch-clamp* en fijación de corriente. El PA se generó mediante pulsos de 5 ms de duración e intensidad de corriente umbral, tanto después de mantener el potencial de la membrana durante 5 minutos a -80 mV (situación control), como tras despolarizar la membrana durante 5 minutos a un potencial subumbral próximo a los -60 mV (Figura R15A). De acuerdo con la visión clásica, al despolarizar sostenidamente la membrana, las neuronas procedentes de ratas de entre 9 y 12 días de edad mostraron un PA con menor velocidad de despolarización y repolarización, y como consecuencia, una mayor duración media (Tabla R8, Figuras R15-17; Velocidad de despolarización: $5,20 \pm 1,66$ % más lenta, $P < 0,01$; Velocidad de repolarización: $16,87 \pm 2,76$ % más lenta, $P < 0,001$; Duración media: $29,12 \pm 4,78$ % más anchos, $P < 0,001$). Estos resultados son similares a los descritos en la sección 2.2.1 cuando se comparó el PA generado por un pulso corto frente al inducido mediante una rampa despolarizante, y ambos sugieren una inactivación parcial de las corrientes transitorias de sodio y de potasio. Sin embargo, el ensanchamiento producido en el PA generado mediante la rampa despolarizante fue mayor que el producido en el PA generado mediante pulso de 5 ms tras despolarizar sostenidamente la membrana (la duración fue un $29,12 \pm 4,78$ % mayor cuando el PA se indujo tras despolarizar sostenidamente la membrana, y un $67,03 \pm 8,46$ % mayor cuando el PA se indujo mediante la rampa despolarizante, $P < 0,001$; la velocidad de repolarización se redujo un $16,87 \pm 2,76$ % cuando el PA se indujo tras despolarizar sostenidamente la membrana, y un $37,52 \pm 3,19$ % cuando el PA se indujo mediante la rampa despolarizante, $P < 0,001$). Esta diferencia puede ser debida a una mayor inactivación

dependiente de voltaje en el PA generado mediante la rampa despolarizante, ya que siguiendo este protocolo, la despolarización fue progresiva hasta alcanzar el umbral de voltaje para el disparo del PA (aproximadamente -53 mV), mientras que en el protocolo seguido con despolarización sostenida, el potencial de la membrana se fijó en torno a los -60 mV, un voltaje más hiperpolarizado y en el que, por tanto, la inactivación dependiente de voltaje sería menor.

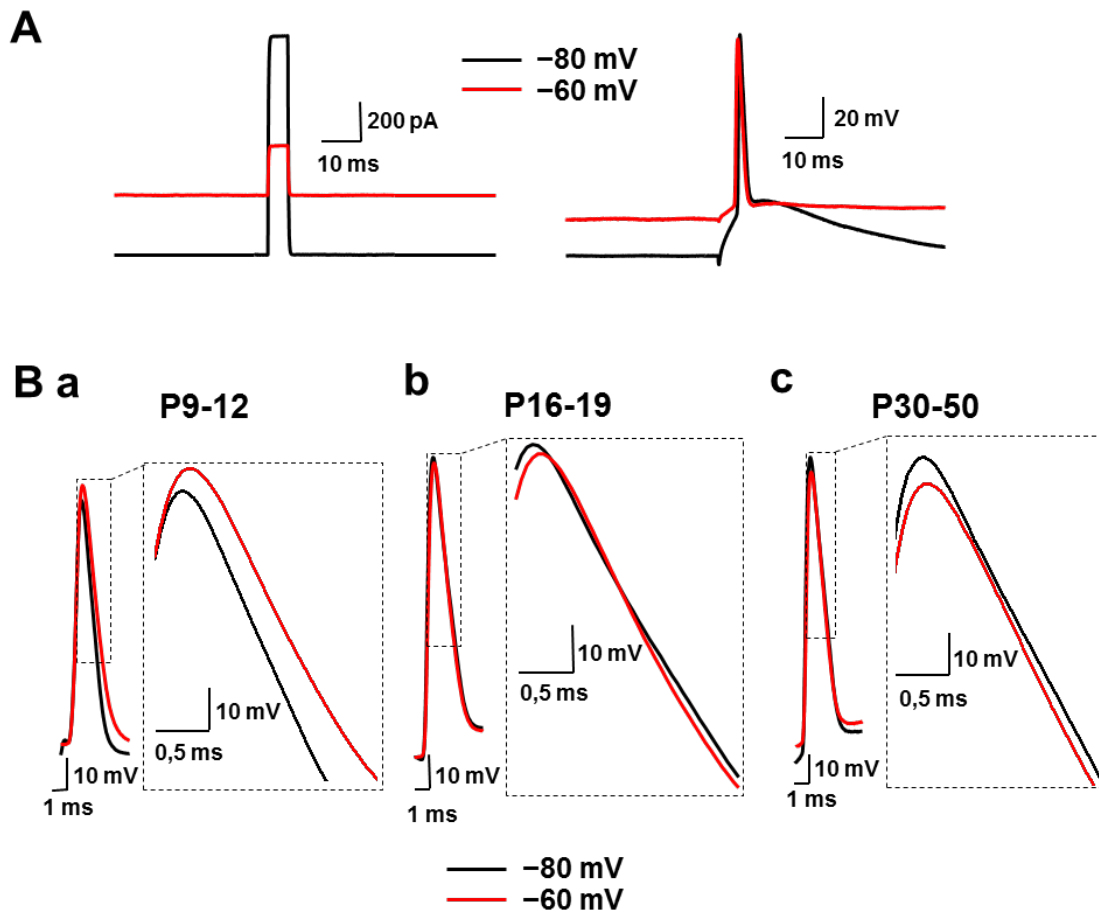


Figura R15. La despolarización sostenida afecta a la morfología del PA de las neuronas piramidales de CA1.

- A)** Protocolos utilizados para la generación del PA. Se aplicaron pulsos cuadrados de corriente con una duración de 5 ms y una intensidad umbral tras fijar la membrana durante 5 minutos a -80 mV (negro) o -60 mV (rojo).
- B)** Ejemplos representativos del PA generado tras fijar la membrana a -80 mV (negro) o -60 mV (rojo). A la derecha de cada PA se muestra ampliada la fase repolarizante. Se aprecia cómo en el grupo P9-12 (**Ba**) el PA se ensancha al despolarizar sostenidamente la membrana con respecto al obtenido tras fijar la membrana a -80 mV, mientras que en los grupos P16-19 (**Bb**) y P30-50 (**Bc**) el PA generado a -60 mV no sólo no tiene una mayor duración media, sino que ésta es menor.

Cuando se repitió el mismo protocolo en ratas del grupo P16-19 también se observó una velocidad de despolarización estadísticamente más lenta al inducir el PA tras fijar la membrana a -60 mV durante 5 minutos, en comparación con la del PA registrado tras a -80 mV (Tabla R8, Figuras R15-17; $6,75 \pm 1,19$ % más lenta, $P < 0,001$). Sin embargo, la velocidad de repolarización fue más rápida, y la duración media fue menor al inducir el PA a -60 mV que tras fijarlo a -80 mV durante 5 minutos (Tabla R8, Figuras R15-17; Velocidad de repolarización: $10,95 \pm 1,83$ % más rápida; Duración media: $6,37 \pm 1,04$ % más estrechos, $P < 0,001$ para los dos parámetros). Estos resultados contrastan con los observados en la sección 2.2.1, donde se puede observar cómo el PA inducido mediante la rampa despolarizante tenía mayor duración media ($10,95 \pm 1,83$ % más ancho, $P < 0,001$) y con menor velocidad de repolarización que el generado por el pulso corto ($8,27 \pm 1,08$ % más lenta, $P < 0,001$). En este caso las diferencias observadas no pueden ser debidas a que se produjo una mayor inactivación dependiente de voltaje en el PA generado mediante rampa despolarizante, pues el umbral de disparo (aproximadamente -59 mV) fue muy similar al empleado en la despolarización sostenida (en torno a los -60 mV).

Tabla R8. La despolarización sostenida afecta a diversos parámetros del PA de las neuronas piramidales de CA1 generado por un pulso de corriente de 5 ms a intensidad umbral.

Edad	P9-12		P16-19		P30-50	
	-80 mV	-60 mV	-80 mV	-60 mV	-80 mV	-60 mV
Amplitud (mV)	$72,1 \pm 1,4$	$76,9 \pm 0,9^{***}$	$89,7 \pm 1,2$	$87,1 \pm 0,9^{**}$	$92,1 \pm 1,9$	$85,0 \pm 0,5^*$
Umbral de disparo (mV)	$-53,1 \pm 0,5$	$-52,0 \pm 0,4^{**}$	$-60,2 \pm 0,6$	$-57,6 \pm 0,5^{***}$	$-58,8 \pm 0,7$	$-54,4 \pm 0,5^{**}$
Vel. despolarización (mV/ms)	$142,8 \pm 4,7$	$135,0 \pm 4,6^{***}$	$202,1 \pm 3,5$	$188,4 \pm 4,0^{***}$	$221,2 \pm 13,7$	$182,1 \pm 6,5^*$
Vel. repolarización (mV/ms)	$-53,1 \pm 1,1$	$-43,7 \pm 1,3^{***}$	$-42,1 \pm 1,4$	$-46,5 \pm 1,3^{***}$	$-38,3 \pm 2,4$	$-41,6 \pm 2,2^*$
Duración media (ms)	$1,21 \pm 0,02$	$1,54 \pm 0,04^{***}$	$1,63 \pm 0,04$	$1,52 \pm 0,03^{***}$	$1,78 \pm 0,06$	$1,68 \pm 0,04^*$
Número de células	36	36	24	24	4	4

-80 mV vs -60 mV, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Además, ambos grupos de edad presentaron un umbral de voltaje para el disparo del PA más despolarizado tras mantener la membrana a un potencial de -60 mV durante 5 minutos, en comparación con el encontrado tras fijar la membrana a -80 mV (Tabla R8, Figuras R15-17; P9-12: $1,86 \pm 0,62$ % más despolarizado, $P < 0,01$; P16-19: $4,15 \pm 1,00$ % más despolarizado, $P < 0,001$). La despolarización del umbral de voltaje y la disminución de la velocidad de despolarización del PA, que también se observaron en la sección 2.2.1, sugieren que la despolarización subumbral sostenida inactiva canales de sodio. Sin embargo, tras despolarizar sostenidamente la membrana a -60 mV, la despolarización del umbral de voltaje para el disparo del PA observada, en comparación con el umbral del PA generado con el potencial de la membrana fijado en -80 mV, fue estadísticamente mayor en el grupo P16-19, con respecto de la despolarización del umbral observada en el grupo P9-12. Además, esta despolarización del umbral de voltaje observada en el grupo P16-19 tras fijar la membrana a -60 mV durante 5 minutos, fue mayor que la despolarización del umbral observada en la sección 2.2.1 cuando se comparó el umbral de voltaje para el disparo del PA generado por el pulso corto con respecto del umbral del PA inducido por la rampa despolarizante en ambos grupos de edad. (Despolarización del umbral en el PA generado tras la fijación de la membrana a -60 mV durante 5 min: P9-12: $1,05 \pm 0,33$ mV; P16-19: $2,67 \pm 0,58$ mV; Despolarización del umbral en PAs generados por rampa de 1s: P9-12: $0,03 \pm 0,54$ mV; P16-19: $1,21 \pm 0,34$ mV; $P < 0,01$. En el análisis mediante la prueba de Bonferroni, la despolarización del umbral encontrada en el grupo P16-19 tras fijar la membrana a -60 mV durante 5 min fue significativamente mayor al resto de grupos – $P < 0,05$ excepto frente a la despolarización del umbral de disparo del PA una vez generado mediante rampa en el grupo P9-12, con $P < 0,01$ -).

Por último, en el grupo P9-12 se observó un incremento en la amplitud del PA generado tras la despolarización sostenida de la membrana, mientras que en el grupo P16-19 el PA no sólo se incrementó, sino que fue de menor amplitud (Tabla R8, Figuras R15-17; P9-12: Amplitud $7,43 \pm 1,35$ % mayor, $P < 0,001$; P16-19: Amplitud $2,66 \pm 0,99$ % menor, $P < 0,05$).

Los resultados observados tras la despolarización subumbral sostenida de la membrana plasmática en el grupo P16-19 (disminución de la duración media del PA, aumento de la velocidad de repolarización, mayor despolarización del umbral de disparo y disminución de la amplitud), sugieren un incremento de las corrientes repolarizantes de potasio activables a potenciales de la membrana subumbrales.

Para apreciar de forma más clara las diferencias observadas en la morfología del PA, se realizaron diagramas de fase representando la velocidad de cambio de voltaje del PA frente al potencial de la membrana que presenta el PA en cada instante (Figura R16). Mediante dicha representación se puede observar cómo:

- La fase de despolarización del PA se ralentizó en ambos grupos al despolarizar sostenidamente la membrana, con respecto de la fase de despolarización del PA generado cuando el potencial de la membrana se fijó a -80 mV.
- La velocidad de la repolarización del PA disminuyó en el grupo P9-12 tras la despolarización sostenida con respecto de la registrada tras fijar el potencial de la membrana a -80 mV. Por el contrario, en el grupo P16-19, la velocidad de la repolarización no sólo no disminuyó, sino que aumentó.
- Cuando se fijó el potencial de la membrana a -60 mV, la amplitud del PA aumentó en las neuronas del grupo P9-12, en comparación con la amplitud encontrada en el PA generado tras fijar la membrana a -80 mV, mientras que en las neuronas en el grupo P16-19 disminuyó.

Para conocer si el comportamiento descrito en el grupo P16-19 es transitorio o se mantiene en el animal adulto, se registraron neuronas procedentes de ratas de entre 30 y 50 días de edad. Éstas presentaron un comportamiento similar al observado en el grupo P16-19 tras la despolarización sostenida de la membrana: el PA tenía mayor velocidad de repolarización ($P<0,05$) y menor duración media ($P<0,05$) que el registrado tras fijar la membrana a -80 mV (Tabla R8, Figuras R15-17)

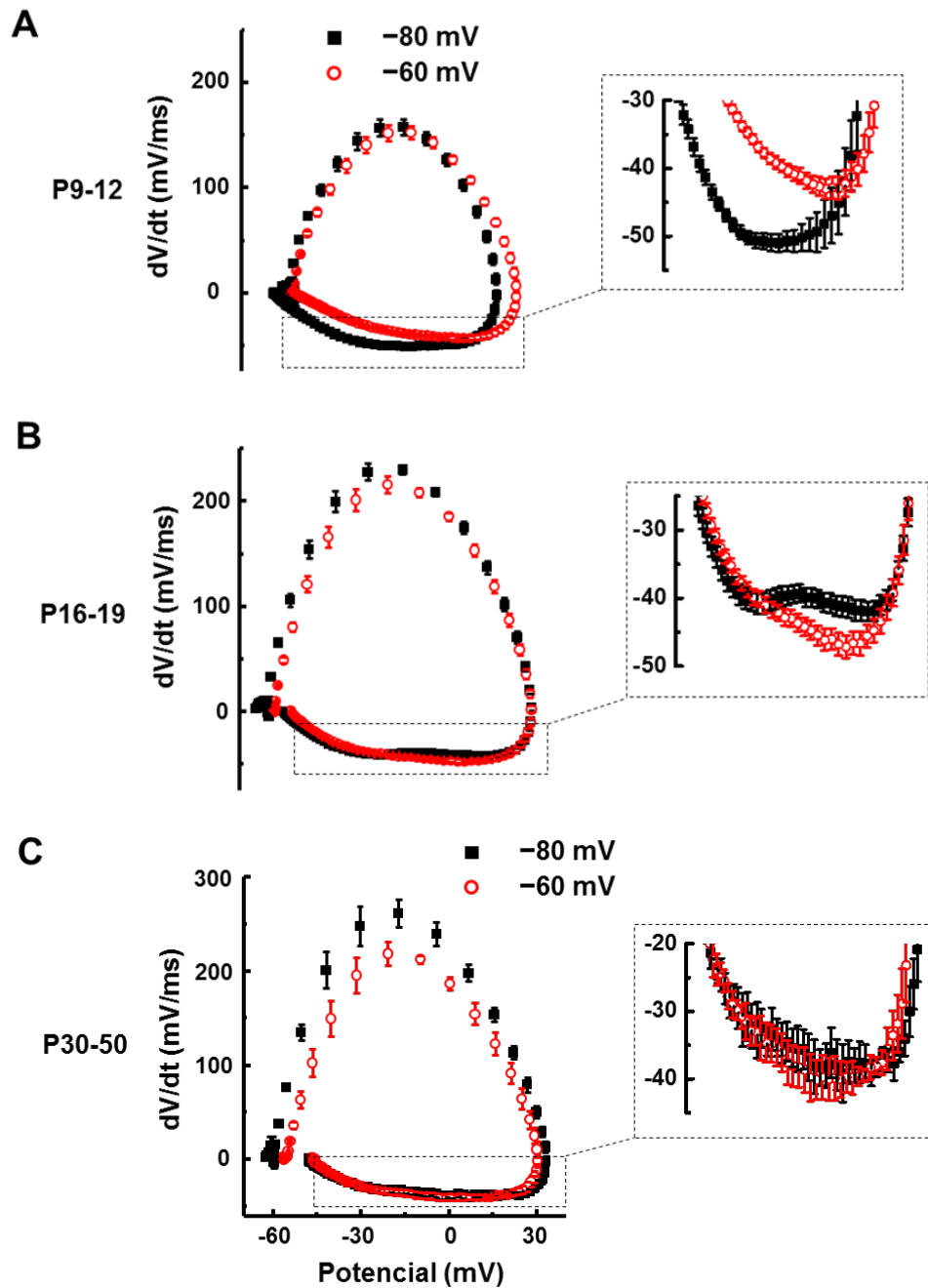


Figura R16. La despolarización sostenida afecta a los diagramas de fase de los PAs de las neuronas piramidales de CA1.

Diagramas de fase promedio de los PAs generados mediante un pulso cuadrado de 5 ms de duración e intensidad umbral, tras fijar durante 5 minutos la membrana a -80 mV (cuadrados negros) o -60 mV (círculos rojos) en los grupos P9-12 (**A**, N=32 células), P16-19 (**B**, N=24 células) y P30-50 (**C**, N=4 células).

En el grupo P9-12 se puede apreciar cómo el PA presenta una velocidad de repolarización más lenta y de mayor amplitud cuando la membrana se fija a -60 mV con respecto del generado cuando se fija a -80 mV. Por el contrario, en los grupos P16-19 y P30-50, la velocidad de repolarización del PA no solo no disminuye, sino que aumenta, y su amplitud disminuye cuando el potencial de la membrana se fija a -60 mV, con respecto del PA generado a -80 mV.

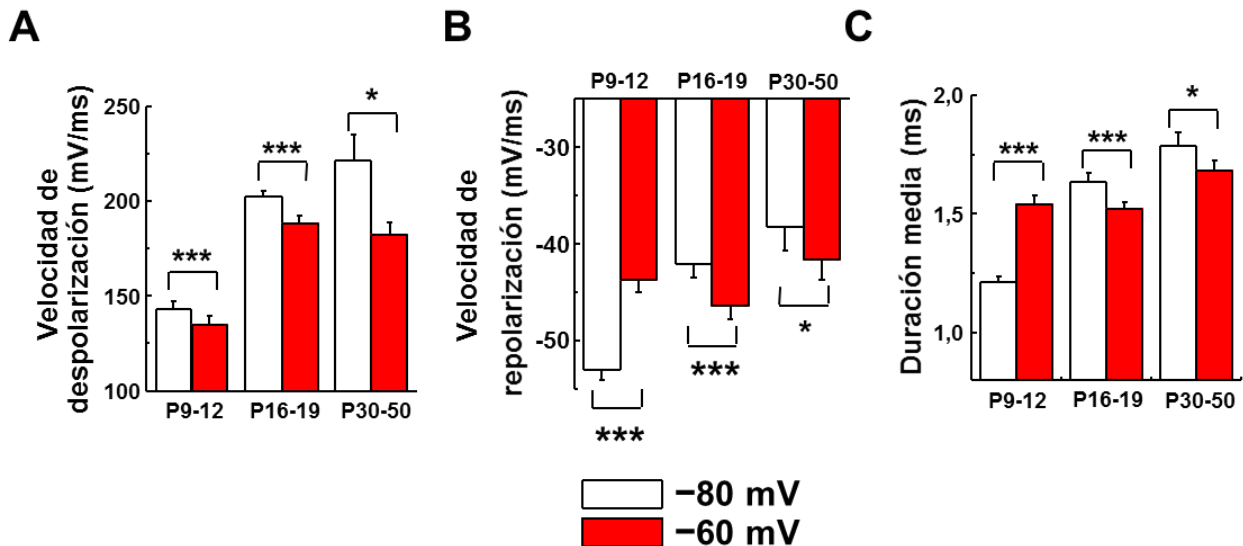


Figura R17. La despolarización sostenida afecta a diversos parámetros del PA de las neuronas piramidales de CA1. Gráficos de barras representando los valores promedio de velocidad de despolarización (**A**), velocidad de repolarización (**B**) y duración media (**C**) del PA generado tras fijar la membrana durante 5 min a -80 mV (blanco) o -60 mV (rojo). Se puede observar cómo al despolarizar la membrana a -60 mV, se reduce la velocidad de despolarización del PA generado en los tres grupos de edad. Sin embargo, mientras que en el grupo P9-12 (N=36 células) también se reduce la velocidad de repolarización y aumenta la duración media, el PA generado en los grupos P16-19 (N=24 células) y P30-50 (N=4 células) tras fijar la membrana a -60 mV tiene una menor duración media y una mayor velocidad de repolarización que el generado tras fijar la membrana a -80 mV.

En resumen, la despolarización sostenida de la membrana provoca dos tipos de comportamiento sobre las corrientes implicadas en el PA de las neuronas piramidales de CA1:

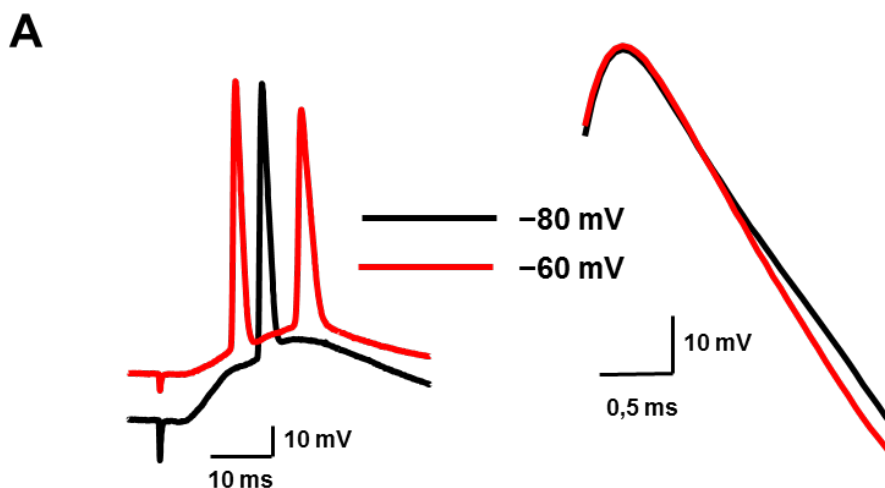
- El PA registrado en neuronas procedentes de ratas del grupo de edad postnatal P9-12 presentó velocidades de despolarización y repolarización más lentas al despolarizar sostenidamente la membrana, y como consecuencia aumentó su duración media a causa de la inactivación parcial de las corrientes de sodio y potasio implicadas en la generación y repolarización del PA.
- El PA registrado en neuronas de los grupos P16-19 y P30-50 tras despolarizar sostenidamente la membrana, también presentó una menor velocidad de despolarización por la inactivación de los canales de sodio y el incremento de las corrientes repolarizantes de potasio. Sin embargo, tuvo una velocidad de repolarización más rápida, y como consecuencia disminuyó su duración media. Además, la despolarización de su umbral de disparo, con respecto al PA registrado tras fijar la membrana a -80 mV, fue mayor que en el grupo P9-

12. Estos datos sugieren un incremento de las corrientes repolarizantes de potasio que se activan a potenciales subumbrales.

El comportamiento observado en los grupos P16-19 y P30-50 sugiere la aparición de una plasticidad intrínseca a corto plazo en respuesta a una despolarización subumbral sostenida de la membrana plasmática, y en la cual parece estar implicado un incremento de las corrientes repolarizantes activadas a potenciales subumbrales.

2.2.3. La plasticidad a corto plazo inducida por despolarización sostenida es detectada cuando el potencial de acción es generado por potenciales sinápticos excitadores.

Considerando que la plasticidad a corto plazo observada a partir del período comprendido entre los 16 y 19 días se manifiesta mediante cambios en la morfología del PA generado por inyección de corriente intrasomática, se estudió si esta plasticidad se detecta también cuando el PA es generado a partir de un potencial excitador postsináptico (PEPS). Para ello se estimularon las fibras comisurales/colaterales de Schaffer para inducir PEPS de amplitud supraumbral en neuronas del grupo P16-19 fijadas al potencial control de -80 mV, y tras despolarizar la membrana a -60 mV durante 5 minutos. Los resultados obtenidos fueron similares a los observados por inyección somática de corriente: el PA tuvo una menor duración media y una mayor velocidad de repolarización tras la despolarización sostenida de la membrana que cuando se generó con el potencial de la membrana fijado a -80 mV (Tabla R9, Figura R18; Duración: $4,59 \pm 0,97$ % más estrecho; Velocidad de repolarización: $11,30 \pm 2,17$ % más rápida, $P < 0,001$ para ambos parámetros). Por tanto, la plasticidad a corto plazo provoca cambios en la morfología del PA inducidos tanto por inyección intrasomática de corriente como en condiciones más fisiológicas (PEPS) en células piramidales de CA1.



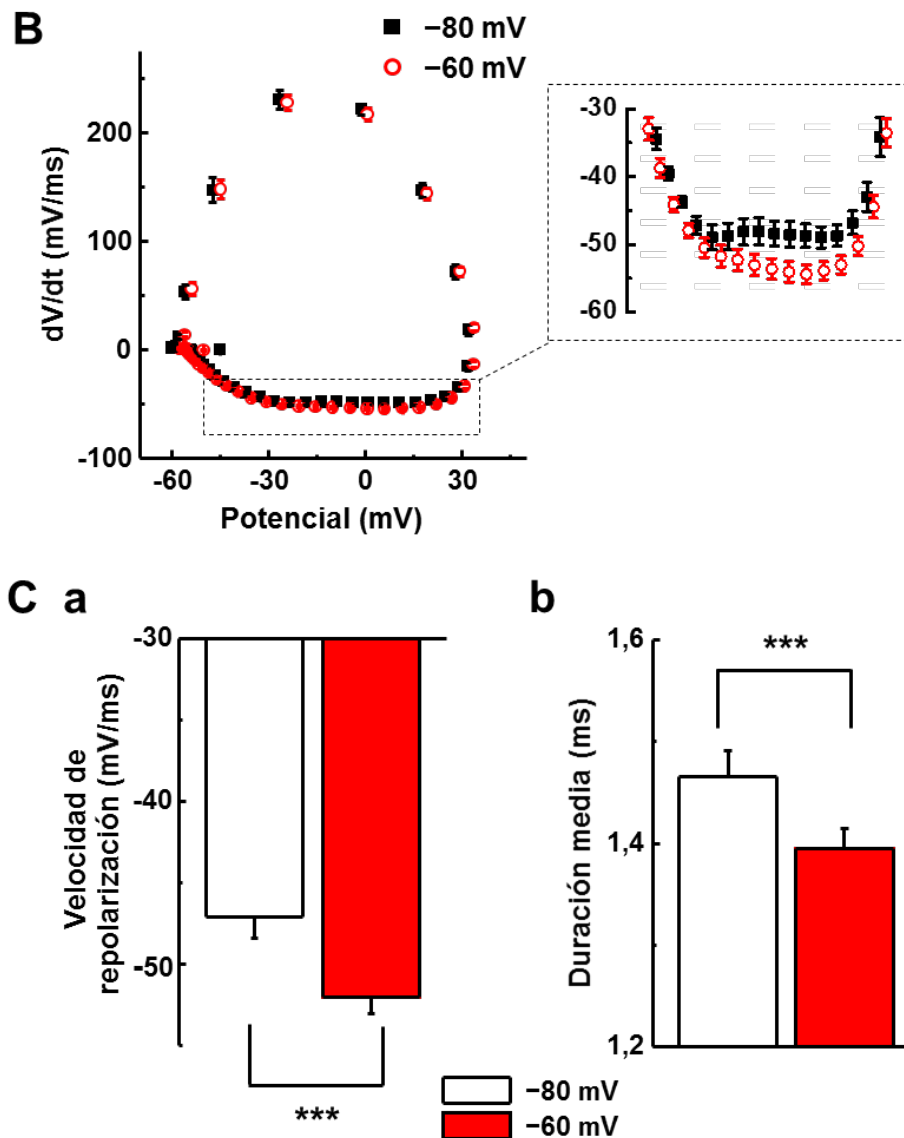


Figura R18. La despolarización sostenida afecta a la morfología del PA generado por PEPs en las neuronas piramidales de CA1 de entre 16 y 19 días.

- A)** Registros representativos del PA generado a partir de un PEPs de amplitud supraumbral al estimular las fibras comisurales/ colaterales de Schaffer tras fijar la membrana a -80 mV (negro) o -60 mV (rojo) durante 5 min. A la derecha se muestra ampliada la fase repolarizante del PA.
- B)** Diagrama de fase del promedio de los PAs inducidos por un PEPs, tras fijar la membrana a -80 mV (cuadrados negros) o a -60 mV (círculos rojos) durante 5 min. A la derecha se muestra ampliada la fase repolarizante.
- C)** Gráficos de barras representando los valores promedio de la velocidad de repolarización **(a)** y la duración media **(b)** de los PAs generados a potenciales de fijación de -80 (blanco) y -60 mV (rojo). Se aprecia cómo los PAs presentan una menor duración media y una repolarización más rápida cuando se fija la membrana a -60 mV, con respecto de cuando se fija a -80 mV. N=22 células.

-80 mV vs -60 mV, *** $P < 0,001$.

Tabla R9. La despolarización sostenida afecta a diversos parámetros del PA generados por PEPS a las neuronas piramidales de CA1.

Edad	P16-19	
Grupo	-80 mV	-60 mV
Amplitud (mV)	89,8 ± 0,9	89,4 ± 1,1
Umbral de disparo (mV)	-49,0 ± 0,7	-47,5 ± 0,8 **
Vel. despolarización (mV/ms)	206,9 ± 3,7	196,7 ± 3,8 **
Vel. repolarización (mV/ms)	-47,1 ± 1,3	-52,0 ± 1,0 ***
Duración media (ms)	1,47 ± 0,03	1,40 ± 0,02***
Número de células	22	22

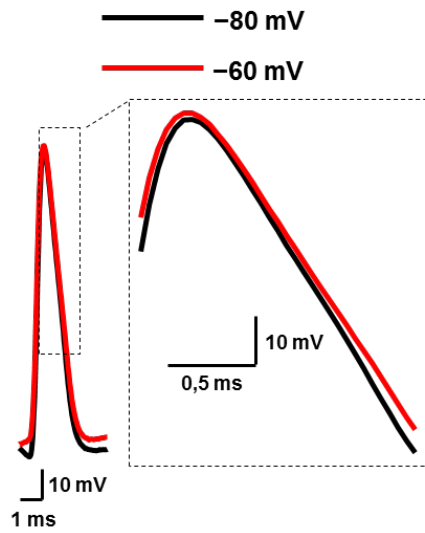
Parámetros del PA generado tras estimular las fibras comisurales/colaterales de Schaffer a dos potenciales de la membrana de fijación.

-80 mV vs -60 mV, ** P < 0,01; *** P < 0,001.

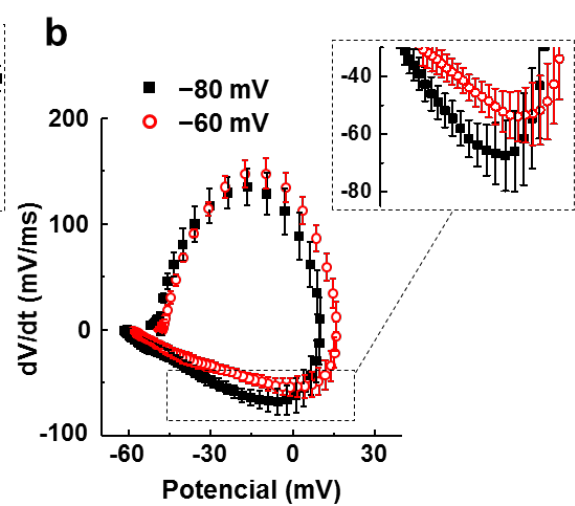
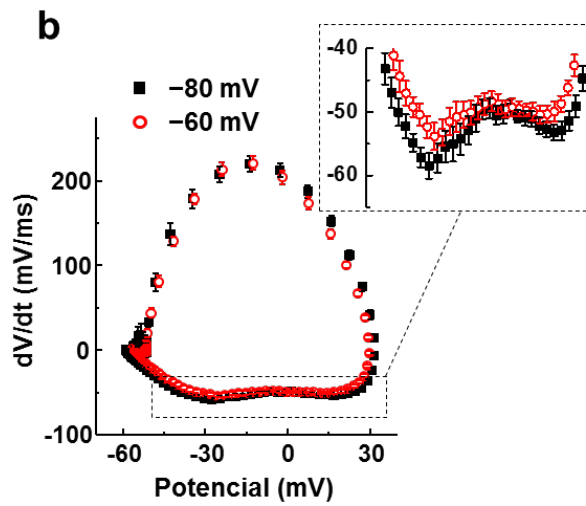
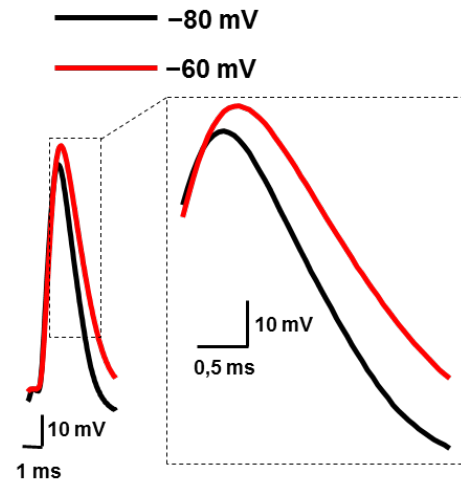
2.2.4. La plasticidad a corto plazo inducida por despolarización sostenida es específica de las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo.

Existen múltiples familias de canales iónicos, y cada tipo neuronal contiene en su membrana plasmática una distinta variedad y proporción de estos canales. Además, se ha descrito que la dependencia de voltaje de las conductancias varía en las distintas neuronas. Como consecuencia, la morfología de los PAs difiere considerablemente entre los distintos tipos neuronales (Chen et al. 1996; Bean 2007). Por ello, la plasticidad a corto plazo inducida por una despolarización subumbral sostenida que se ha observado en neuronas piramidales de CA1 a partir del período comprendido entre los 16 y 19 días de edad podría no expresarse en otros tipos neuronales. Para comprobar si la plasticidad se expresaba en otros tipos neuronales del hipocampo, se evaluó el efecto de la despolarización sostenida sobre la morfología del PA generado mediante la inyección intrasomática de pulsos cuadrados de corriente con una duración de 5 ms a intensidad de corriente umbral, en interneuronas del área CA1 y en neuronas piramidales del área CA3 procedentes de ratas de entre 16 y 19 días de edad. Tras despolarizar sostenidamente la membrana, tanto las interneuronas de CA1 como las neuronas piramidales de CA3 presentaron PAs con una mayor duración media y una velocidad de repolarización más lenta (Tabla R10, Figura R19; Interneuronas: Velocidad de repolarización: $21,52 \pm 4,49$ % más lenta, $P < 0,001$; Duración media: $25,67 \pm 6,30$ % más anchos, $P < 0,01$; Piramidales CA3: Velocidad de repolarización: $5,10 \pm 1,64$ % más lenta; Duración media: $2,74 \pm 1,15$ % más anchos, $P < 0,05$ para ambos parámetros). Estos resultados fueron similares a los encontrados en neuronas piramidales de CA1 del grupo P9-12, edad en la que la plasticidad todavía no se había desarrollado. Por lo tanto, la plasticidad observada tras despolarizar sostenidamente la membrana a potenciales subumbrales parece ser específica de neuronas piramidales de CA1 (o al menos no se expresa en todos los tipos celulares dentro del hipocampo).

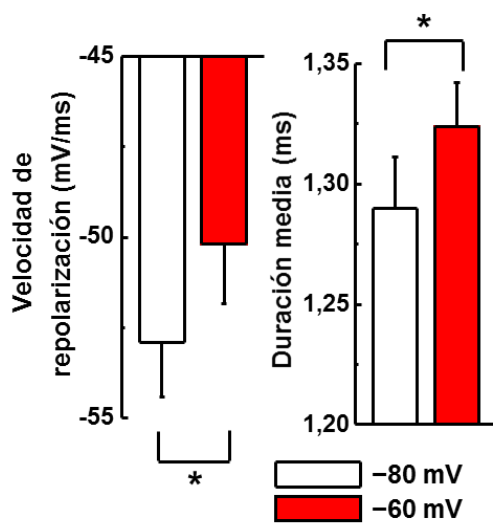
A a Piramidales CA3



B a Interneuronas



A c Piramidales CA3



B c Interneuronas

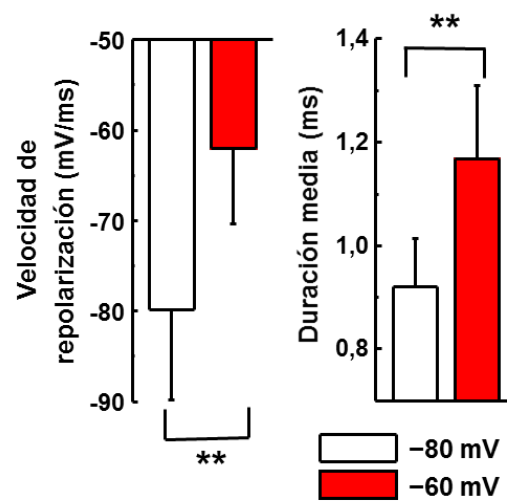


Figura R19. Las neuronas piramidales de CA3 y las interneuronas de CA1 no presentan la plasticidad a corto plazo inducida por una despolarización sostenida.

- A)** Morfología del PA generado en neuronas piramidales de CA3 de ratas del grupo P16-19 mediante un pulso de 5 ms de duración a intensidad umbral. **Aa)** Registro representativo del PA generado tras fijar la membrana a -80 mV (negro) o -60 mV (rojo) durante 5 min. A la derecha se muestra ampliada la fase repolarizante. **Ab)** Diagrama de fase del promedio de los PAs generados en neuronas piramidales de CA3 tras fijar la membrana a -80 mV (cuadrados negros) o -60 mV (círculos rojos) durante 5 min. A la derecha se amplía la fase repolarizante. **Ac)** Gráfico de barras representando los valores promedio de la velocidad de repolarización y la duración media de los PAs generados en neuronas piramidales de CA3 tras fijar la membrana a -80 mV (blanco) o a -60 mV (rojo) durante 5 min. N= 9 células.
- B)** Morfología del PA generado en interneuronas de CA1 de ratas del grupo de edad P16-19 mediante un pulso de 5 ms de duración e intensidad umbral. **Ba)** Idem que Aa para interneuronas de CA1. **Bb)** Idem que Ab para interneuronas de CA1. **Bc)** Idem que Ac para interneuronas de CA1. N= 11 células.

En ambos tipos neuronales se aprecia cómo el PA generado tras fijar la membrana a -60 mV tiene mayor duración media y menor velocidad de repolarización que el generado tras fijar la membrana a -80 mV.

-80 mV vs -60 mV, * P < 0,05; ** P < 0,01.

Tabla R10. Las neuronas piramidales de CA3 y las interneuronas de CA1 no presentan plasticidad a corto plazo inducida por despolarización sostenida.

Tipo celular	Piramidales CA3		Interneuronas CA1	
	-80 mV	-60 mV	-80 mV	-60 mV
Amplitud (mV)	86,9 ± 1,4	84,2 ± 1,6	62,9 ± 2,7	66,7 ± 3,3
Umbral de disparo (mV)	-55,6 ± 1,3	-54,1 ± 1,0	-49,6 ± 2,1	-49,0 ± 0,9
Vel. despolarización (mV/ms)	200,6 ± 5,8	187,2 ± 6,6 *	141,7 ± 13,5	131,5 ± 10,7
Vel. repolarización (mV/ms)	-52,9 ± 1,5	-50,2 ± 1,7 *	-79,8 ± 10,0	-62,0 ± 8,3 **
Duración media (ms)	1,29 ± 0,02	1,32 ± 0,02 *	0,92 ± 0,09	1,17 ± 0,14 **
Número de células	9	9	11	11

Cambios producidos por el potencial de la membrana de fijación en los parámetros del PA generado mediante un pulso de 5 ms de duración e intensidad de corriente umbral.

-80 mV vs -60 mV, P < 0,05; *** P < 0,01.

2.3. Perfiles temporales para la inducción y extinción de la plasticidad intrínseca a corto plazo inducida por una despolarización sostenida.

2.3.1. Perfil temporal del proceso de inducción de la plasticidad intrínseca a corto plazo.

En las secciones anteriores se observó dos comportamientos distintos ante una despolarización sostenida de la membrana de las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo:

- Un ensanchamiento del PA generado mediante una rampa despolarizante de intensidad creciente de 1 segundo de duración, con respecto del inducido mediante un pulso de 5 ms de mayor intensidad. Este ensanchamiento se explica por la inactivación parcial de las corrientes de sodio y potasio dependientes de voltaje que intervienen en la generación del PA.
- Una plasticidad intrínseca a corto plazo al despolarizar sostenidamente la membrana que aparece a partir de los 16 días de edad postnatal. Esta plasticidad incrementa la velocidad de repolarización del PA, disminuyendo su duración en lugar de ensanchar el PA, como ocurre en el grupo P9-12, en el cual la plasticidad aún no se ha desarrollado.

Dado que a intervalos de despolarización cortos (Figura R13) se inactivan las corrientes repolarizantes, tanto en el grupo que no presenta plasticidad intrínseca a corto plazo (grupo 9-12) como en el que la presenta (P16-19), se diseñaron una serie de experimentos mediante registros de *patch-clamp* en modo de fijación de corriente sobre las neuronas piramidales de CA1, con el fin de determinar el tiempo mínimo de despolarización necesario para inducir esta plasticidad. Para ello, se realizaron experimentos en los que tras fijar la membrana a -80 mV durante al menos 5 minutos (potencial de fijación control), se despolarizó la membrana a -60 mV. Primero se generó un PA tras fijar el potencial de la membrana a -80 mV durante 5 minutos y posteriormente, tras fijar la membrana a -60 mV, se generaron PAs a diferentes intervalos de tiempo: 1, 15 y 30 segundos, y 1, 1.5, 3, 5, 7.5, 10 y 15 minutos (Figura R20). Cada PA se indujo mediante la inyección de pulsos de 5 ms de duración a intensidad de corriente umbral.

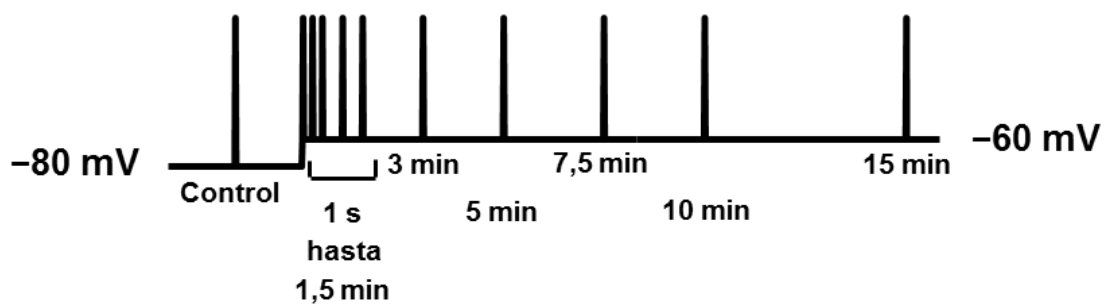


Figura R20. Protocolo seguido para estudiar el perfil temporal del proceso de inducción de la plasticidad de la excitabilidad intrínseca a corto plazo.

Diagrama del protocolo empleado para estudiar el perfil temporal del proceso de inducción de la plasticidad intrínseca a corto plazo. Tras partir de un potencial de la membrana a -80 mV (control) durante al menos 5 minutos, se despolarizó la membrana a -60 mV. Primero se generó un PA tras fijar el potencial de la membrana a -80 mV durante 5 minutos y posteriormente, tras fijar la membrana a -60 mV, se generaron PAs a diferentes intervalos de tiempo (1, 15 y 30 segundos, y 1, 1,5, 3, 5, 7,5, 10 y 15 minutos) mediante pulsos de 5 ms de duración a intensidad de corriente umbral.

Cuando se analizan los PAs generados se observa que los parámetros obtenidos en el grupo P9-12 son similares independientemente de la duración de la despolarización (Duración: $P=0,976$; Repolarización: $P<0,995$). Se caracterizan por presentar una mayor duración media y una velocidad de repolarización más lenta que el PA generado con un potencial de la membrana de -80 mV (Figura R21). El resultado es el esperado para este grupo de edad en la que aún no se ha expresado la plasticidad intrínseca a corto plazo e indica la inactivación parcial de las corrientes de sodio y de potasio al despolarizar la membrana.

Sin embargo, en el grupo P16-19 cambiaron la duración media y la velocidad de repolarización con la duración de la despolarización ($P<0,001$ en ambos parámetros). La mayor duración media y la velocidad de repolarización más lenta debida a la inactivación de corrientes sólo apareció a intervalos de despolarización menores de 15 s (Tiempo 1 s: Repolarización: $2,97 \pm 0,98$ % más lenta, $P<0,01$; Duración media: $4,19 \pm 0,62$ % más anchos, $P<0,001$). Posteriormente, se desarrolla el proceso de inducción de la plasticidad intrínseca a corto plazo. Para estudiar la evolución temporal del proceso de inducción de dicha plasticidad, se calcularon las diferencias entre los parámetros (duración media y velocidad de repolarización) de cada PA generado a los distintos intervalos de tiempo de despolarización y los del PA generado tras 1 segundo de despolarización (intervalo de tiempo tras el cual no

parecía observarse plasticidad, considerándose el 0 % de plasticidad). Posteriormente, se normalizaron estas diferencias con respecto a las observadas entre los parámetros del PA generado a los 15 minutos de despolarización (intervalo en el que se esperaba que la plasticidad fuera máxima, considerándose como 100 % de plasticidad) y los del PA generado tras 1 segundo de despolarización (ver más detalles en Material y Métodos). Siguiendo este criterio se observó que el 50 % de la plasticidad se expresaba tras despolarizar la membrana durante 30 s y llegando a un máximo estable en torno a los 5 minutos (Tiempo 1 s: Repolarización: $9,40 \pm 1,47$ % más rápida, $P < 0,001$; Duración media: $4,79 \pm 0,80$ % más estrechos, $P < 0,001$) (Figura R22).

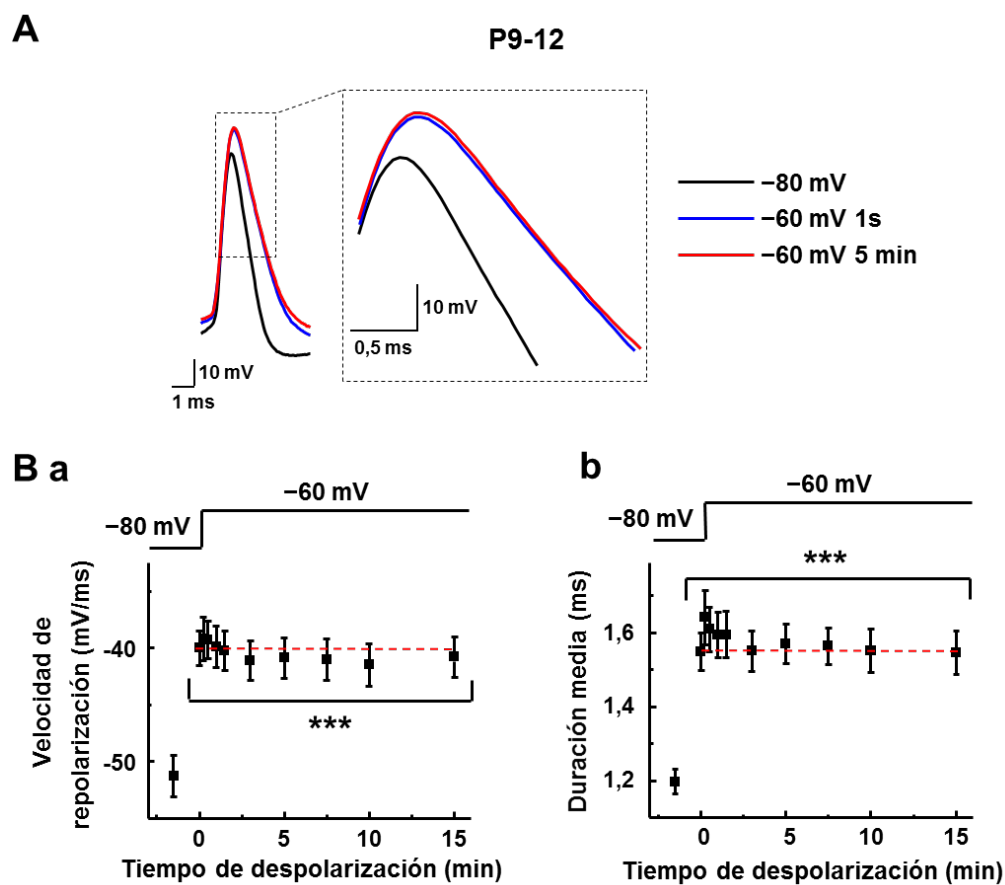


Figura R21. En el grupo de edad P9-12 los parámetros del PA son similares independientemente de la duración de la despolarización a -60 mV.

- A)** Registros representativos de los PAs obtenidos en el grupo P9-12 tras fijar el potencial de la membrana a: -80 mV durante 5 minutos (negro), -60 mV durante 1 s (azul) y -60 mV durante 5 min (rojo).
- B)** Gráficos que muestran los valores promedio de velocidad de repolarización (**Ba**) y la duración media (**Bb**) con respecto a la duración de la despolarización en el grupo P9-12. Se puede apreciar cómo tras despolarizar la membrana a -60 mV, el PA generado disminuye su velocidad de repolarización y aumenta su duración en todos los intervalos de tiempo estudiados. N=21 células

Control a -80 mV vs cada valor a -60 mV, *** $P < 0,001$.

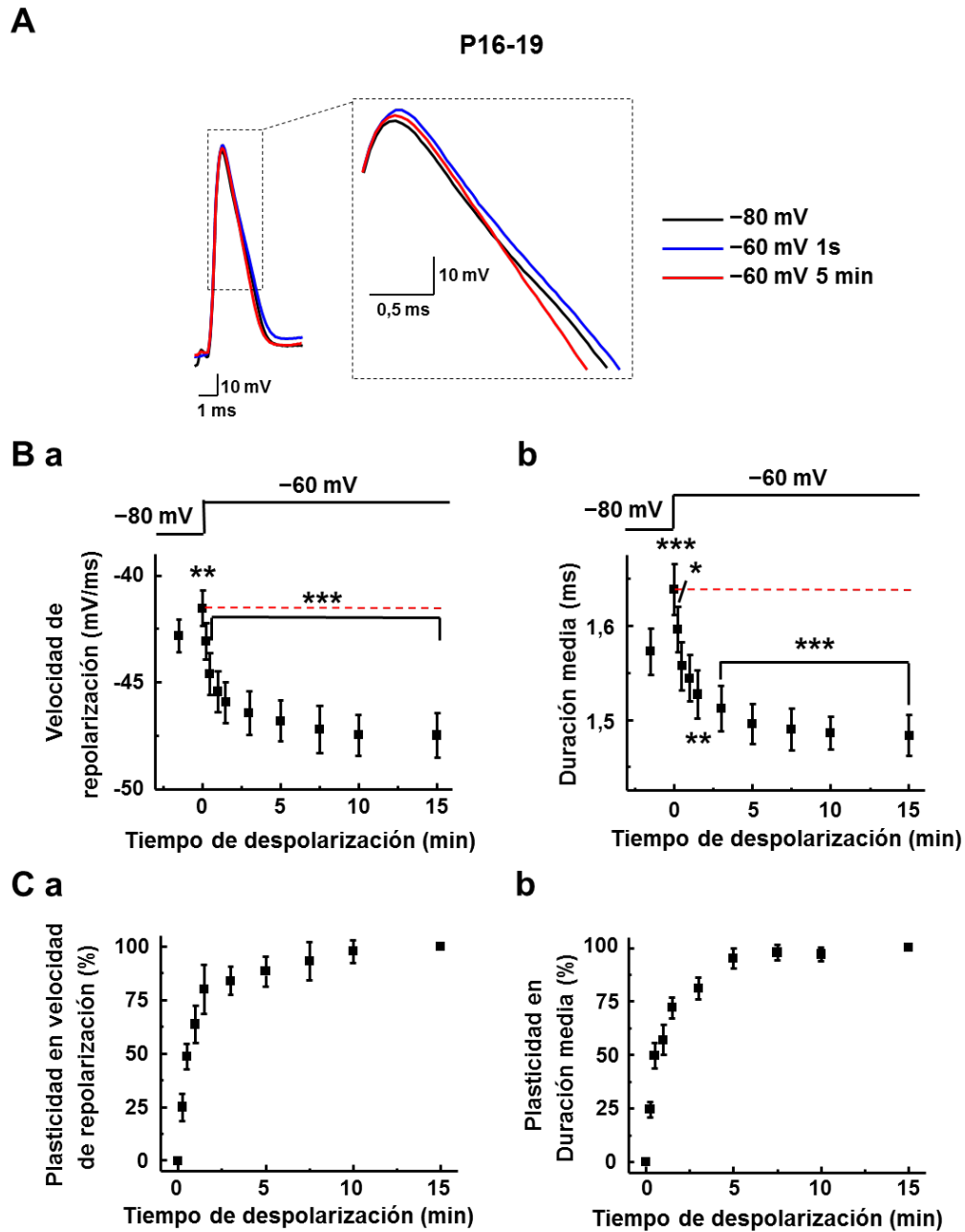


Figura R22. Evolución temporal del proceso de inducción de la plasticidad de la excitabilidad intrínseca a corto plazo.

- A)** Registros representativos de los PAs generados en el grupo de edad P16-19: tras fijar el potencial de la membrana a: -80 mV durante 5 min (negro), -60 mV durante 1 s (azul) y -60 mV durante 5 min (rojo).
- B)** Gráficos que muestran los valores promedio de la velocidad de repolarización (**Ba**) y la duración media (**Bb**) frente a la duración de la despolarización en el grupo P16-19. Se puede observar cómo tras despolarizar la membrana a -60 mV, los PAs registrados sólo presentan mayor duración durante los primeros 15 segundos. N=17 células.
- C)** Gráfico que muestra el porcentaje de los cambios en velocidad de repolarización (**Ca**) y duración media (**Cb**) frente a la duración de la despolarización de la membrana a -60 mV. N=17 células.

Control a -80 mV vs cada valor a -60 mV, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

2.3.2. Perfil temporal del proceso de extinción de la plasticidad intrínseca a corto plazo.

Después del estudio del perfil temporal de la inducción, se evaluó el tiempo necesario para la desaparición de la plasticidad, para lo cual se realizaron experimentos en los que primero se fijaba durante al menos 5 minutos el potencial de la membrana a -60 mV, para luego hiperpolarizar la membrana a -80 mV (potencial de fijación control). Primero se generó un PA tras fijar el potencial de la membrana a -60 mV durante 5 minutos y posteriormente, tras fijar la membrana a -80 mV, se generaron PAs a diferentes intervalos de tiempo (1, 15 y 30 s, y 1, 1.5, 3, 5, 7.5, 10 y 15 min) mediante pulsos de corriente despolarizante, de 5 ms de duración a intensidad de corriente umbral (Figura R23). La morfología de los PAs registrados a distintos intervalos de tiempo tras fijar la membrana a -80 mV se comparó con la del PA generado cuando el potencial de la membrana se encontraba fijado a -60 mV.

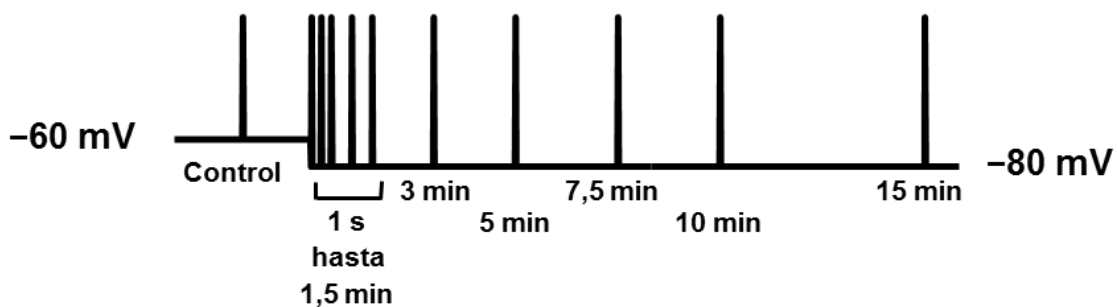


Figura R23. Protocolo para estudiar el perfil temporal del proceso de extinción de la plasticidad de la excitabilidad intrínseca a corto plazo.

Diagrama del protocolo empleado para estudiar el perfil temporal de proceso de extinción de la plasticidad intrínseca a corto plazo. Tras partir de un potencial de la membrana de -60 mV durante al menos 5 minutos, se hiperpolarizó la membrana a -80 mV (potencial de fijación control). Primero se generó un PA tras fijar el potencial de la membrana a -60 mV durante 5 minutos y posteriormente, tras fijar la membrana a -80 mV, se generaron PAs a diferentes intervalos de tiempo (1, 15 y 30 segundos, y 1, 1.5, 3, 5, 7.5, 10 y 15 minutos) mediante pulsos de 5 ms de duración a intensidad de corriente umbral.

Cuando se analizan los PAs generados se observa que los parámetros obtenidos en el grupo P9-12, en el que no se produjo plasticidad, son similares independientemente de la duración de la hiperpolarización (Duración: $P=0,999$; Repolarización: $P=0,994$). Se caracterizan por presentar menor duración media y mayor velocidad de repolarización cuando se retornó el potencial de la membrana al -80 mV (control), con respecto al registrado tras despolarizar sostenidamente la membrana a -60 mV, debido a la desinactivación de los canales dependientes de voltaje inactivos (Figura R24).

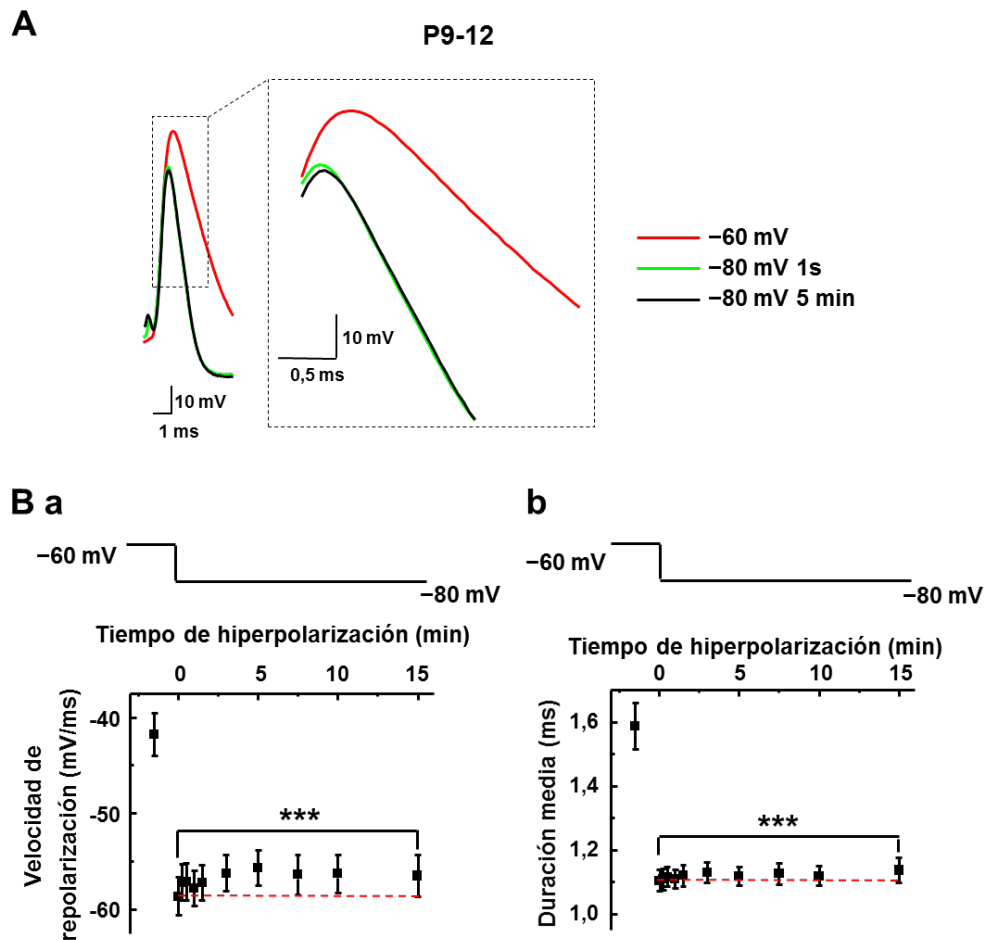


Figura R24. En el grupo de edad P9-12 los parámetros del PA son similares independientemente de la duración de la hiperpolarización a -80 mV.

- A)** Registros representativos de los PAs generados en el grupo de edad P9-12 tras fijar el potencial de la membrana a: -80 mV durante 5 min (negro), -60 mV durante 1 s (azul) y -60 mV durante 5 min (rojo).
- B)** Gráficos que muestran los valores promedio de la velocidad de repolarización (**Ba**) y la duración media (**Bb**) con respecto de la duración de la hiperpolarización a -80 mV en el grupo P9-12. Se puede apreciar cómo tras fijar el potencial de la membrana a -80 mV, el PA generado tiene una mayor velocidad de repolarización y disminuye su duración media en todos los intervalos de tiempo estudiados. $N=16$ células.

Control a -60 mV vs cada valor a -80 mV, *** $P < 0,001$.

Por el contrario, los parámetros cambiaron con la duración de la hiperpolarización en el grupo P16-19, (Duración: $P<0,05$; Repolarización: $P<0,01$). Sólo se encontró un PA de menor duración y con mayor velocidad de repolarización cuando el tiempo transcurrido a -80 mV fue de 1 segundo (Repolarización: $3,25 \pm 0,92$ % más rápida, $P<0,01$; Duración media: $3,89 \pm 0,60$ % más anchos, $P<0,001$), probablemente debido a la desinactivación de los canales previamente inactivos y a que la plasticidad seguía presente. Posteriormente se desarrolla el proceso de desaparición de la plasticidad intrínseca a corto plazo. Para determinar la evolución temporal del proceso de extinción de la plasticidad, se calcularon las diferencias entre los parámetros (duración media y velocidad de repolarización) de cada PA generado a los distintos intervalos de tiempo desde el retorno a -80 mV y los del PA generado tras fijar la membrana a -80 mV durante 15 minutos (intervalo en el que se esperaba que la plasticidad se hubiera extinguido por completo, considerándose como 0 % de plasticidad). Seguidamente se normalizaron estas diferencias con respecto de las observadas entre los parámetros del PA generado tras 1 segundo desde el retorno a -80 mV (intervalo de tiempo tras el cual la plasticidad parecía seguir presente, y por tanto se tomó como 100 % de plasticidad) y las observadas en el PA generado tras fijar la membrana a -80 mV durante 15 minutos (ver más detalles en Material y Métodos). Siguiendo este criterio, se observó que a los 15 segundos ya sólo se expresaba el 50 % de la plasticidad, desapareciendo por completo en torno a los 5 minutos de llevar el potencial de la membrana a -80 mV (Repolarización: $4,71 \pm 0,85$ % más lenta, $P<0,001$; Duración media: $3,05 \pm 0,51$ % más anchos, $P<0,001$), (Figura R25).

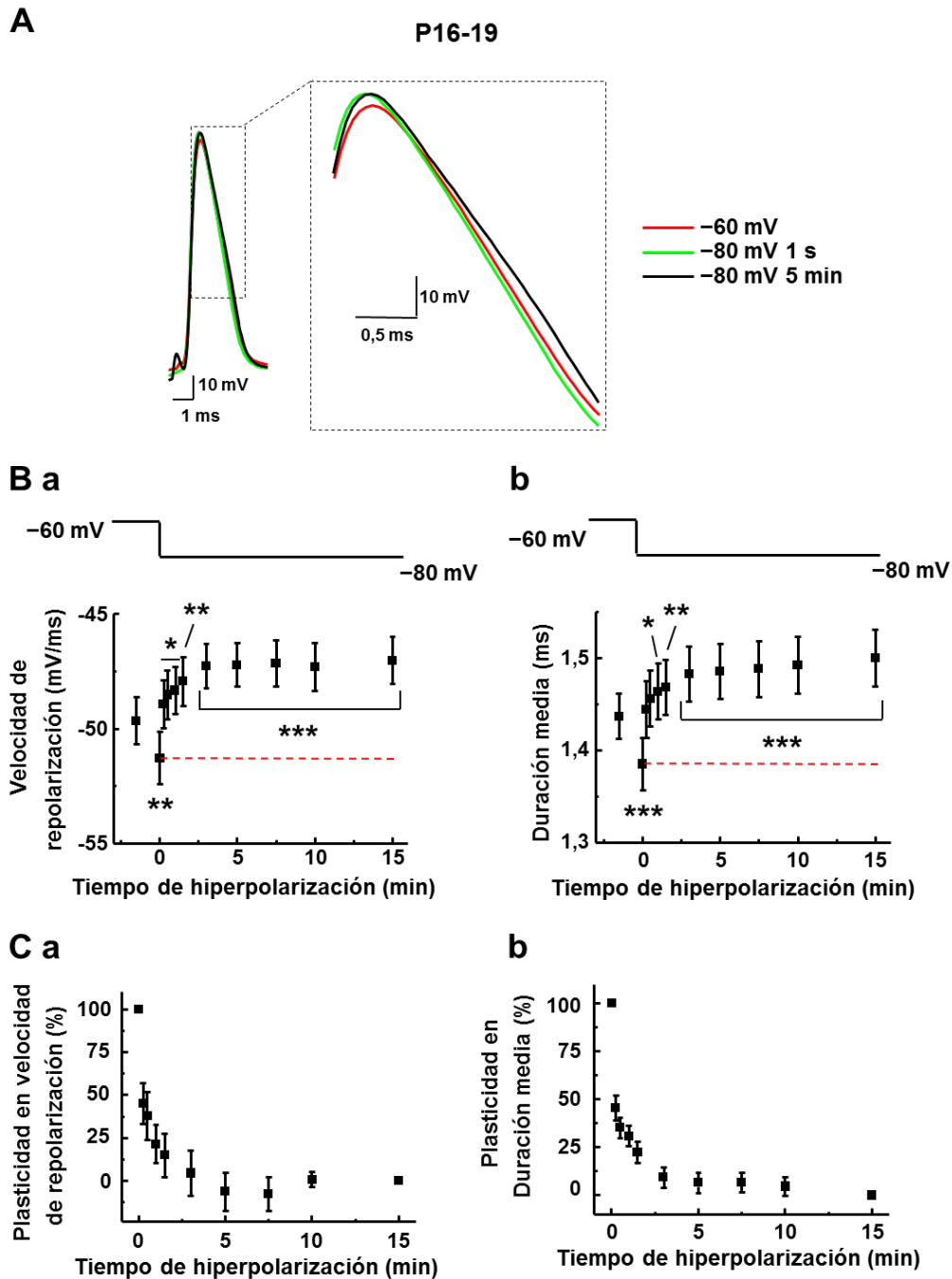


Figura R25. Evolución temporal del proceso de extinción de la plasticidad de la excitabilidad intrínseca a corto plazo.

- A)** Registros representativos de los PAs generados en el grupo de edad P16-19 tras fijar el potencial de la membrana a: -80 mV durante 5 min (negro), -60 mV durante 1 s (azul) y -60 mV durante 5 min (rojo).
- B)** Gráficos que muestran los valores promedio de velocidad de repolarización (**Ba**) y duración media (**Bb**) frente a la duración de la hiperpolarización en el grupo P16-19. Se puede observar que el PA registrado tras hiperpolarizar la membrana a -80 mV sólo es de menor duración que el generado a un potencial de la membrana de -60 mV durante un período inferior a 15 segundos. N=20 células.
- C)** Gráfico que muestra el porcentaje de los cambios en la velocidad de repolarización (**Ca**) y la duración media (**Cb**) frente a la duración de la hiperpolarización de la membrana a -80 mV. N=20 células.

Control a -60 mV vs cada valor a -80 mV, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

2.4. La plasticidad intrínseca a corto plazo disminuye la excitabilidad neuronal.

2.4.1. En respuesta a pulsos largos.

Un tema que ha causado interés en neurociencia ha sido el estudio de cómo las neuronas modifican las propiedades de entrada-salida en función de su actividad (Beck & Yaari 2008). Diversos grupos han descrito cambios en la excitabilidad neuronal debidos a un incremento en corrientes de potasio y/o una disminución en corrientes de calcio como respuesta al aumento de la actividad neuronal, bien inducida por despolarizaciones sostenidas (Franklin et al. 1992; Moulder et al. 2003; O'Leary et al. 2010; Tong et al. 2010), o mediante estimulación sináptica (Fan et al. 2005; Campanac & Debanne 2008; Brown & Randall 2009; Jung & Hoffman 2009). Para determinar si la plasticidad descrita en los apartados anteriores altera la excitabilidad de la membrana, se realizaron registros de *patch-clamp* en modo de fijación de corriente, en los que se examinó la capacidad de la neurona para generar PAs en respuesta a la inyección intrasomática de corriente en una situación control (con el potencial de la membrana fijado a -80 mV), y tras la despolarización sostenida de la membrana a -60 mV durante al menos 5 minutos.

En una primera serie de experimentos, se aplicaron pulsos de corriente despolarizante, de 1 segundo de duración y de intensidad creciente (siguiendo el protocolo descrito en la Figura R7) y se analizó la frecuencia de disparo de los PAs mediante curvas de entrada-salida. Las curvas de entrada-salida representan la frecuencia de disparo de los PAs frente a la intensidad de corriente aplicada (Bekkers & Delaney 2001; Cudmore et al. 2010; Mozzachiodi & Byrne 2010; O'Leary et al. 2010; Sánchez-Alonso et al. 2012). El presente estudio se realizó con dos potenciales de la membrana de fijación distintos (-80 mV y -60 mV). Por tanto, el umbral de corriente para el disparo de los PAs fue distinto en cada voltaje de fijación. Para eliminar esta diferencia, las curvas de entrada-salida se realizaron tomando como referencia el umbral de corriente. De este modo, se representó la frecuencia de descarga frente a la intensidad de corriente añadida a la mínima necesaria para la generación de un PA. A esta intensidad de corriente añadida se le llamó corriente supraumbral.

En ambos grupos de edad, la intensidad de corriente supraumbral requerida para generar el mismo número de PAs es menor cuando la membrana se despolarizó a -60 mV, con respecto de cuando la membrana se fijó a -80 mV (Figura R26, P9-12: $P < 0,001$ para el factor potencial de fijación, P16-19: $P < 0,001$ para el factor potencial de fijación). Este resultado está relacionado con las diferencias encontradas en las propiedades básicas de la membrana. La mayor resistencia de la membrana que se encontró al fijar la membrana a -60 mV, con respecto de la encontrada tras fijar la membrana a -80 mV (Tabla R6, Figura R11), produce un mayor cambio de voltaje en respuesta a un pulso de igual intensidad de corriente, disparando un mayor número de PAs.

Con el objetivo de analizar la excitabilidad de la membrana en función de las propiedades activas, se compensaron las diferencias debidas a la resistencia de la membrana. Para ello, se realizaron nuevas curvas de entrada-salida representando la frecuencia de disparo de los PAs frente al potencial de estabilización teórico que alcanzaría la membrana en cada pulso de corriente despolarizante según la ley de Ohm. Una vez eliminada la influencia de la resistencia de la membrana, las neuronas del grupo P9-12 presentan unas curvas de entrada-salida similares independientemente del potencial al que se encontrara fijada la membrana (Figura R27Ba, $P = 0,395$ para el factor potencial de fijación), resultado esperado en un grupo en el que la plasticidad no se expresaba. Sin embargo, en las neuronas del grupo P16-19, en el cual estaba presente la plasticidad a corto plazo descrita en secciones anteriores, la frecuencia de disparo de los PAs fue más baja cuando se despolarizó sostenidamente la membrana a -60 mV, con respecto de la situación control, en la que el potencial se encontraba fijado a -80 mV (Figura R27Bb, $P < 0,001$ para el factor potencial de fijación).

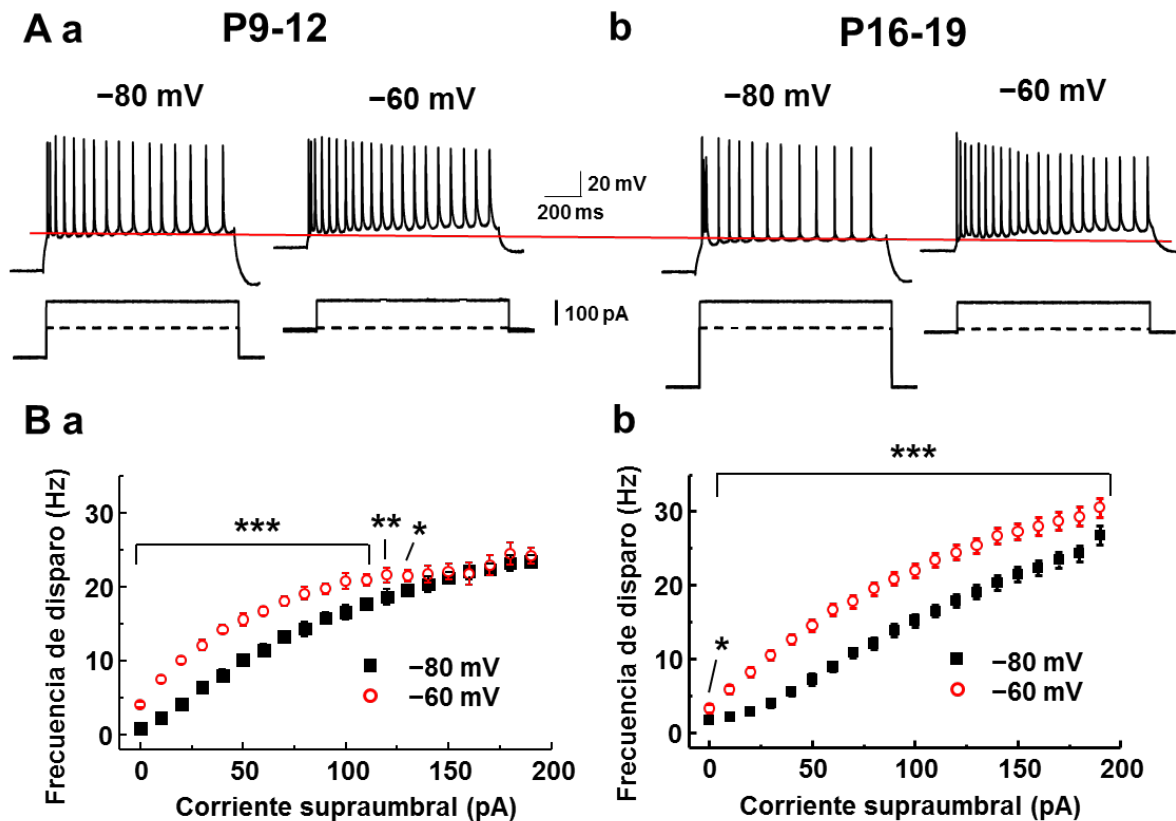


Figura R26. La excitabilidad neuronal aumenta cuando se despolariza el potencial de la membrana.

Para eliminar las diferencias debidas al potencial de la membrana de fijación, las curvas entrada-salida se realizaron tomando como referencia el umbral de corriente. Dicha intensidad se denominó corriente supraumbral (la intensidad de corriente añadida a la mínima necesaria para disparar un PA).

- A) Registros representativos de los PAs generados por pulsos a intensidades de corriente supraumbrales de 100 pA cuando el potencial de la membrana se fijó durante 5 min a -80 mV o a -60 mV, en neuronas de los grupos P9-12 (Aa) y P16-19 (Ab). La línea negra discontinua muestra la intensidad de corriente supraumbral. La línea roja continua muestra el potencial de estabilización de los registros cuya membrana se fijó a -80 mV. Se observa que la frecuencia de disparo a la misma inyección de corriente supraumbral es menor cuando se fija la membrana a -80 mV que cuando se fija a -60 mV, debido a que la despolarización producida por el pulso es mayor cuando se fija la membrana a -60 mV que la generada tras fijar la membrana a -80 mV.
- B) Curvas de entrada-salida que representan la frecuencia de disparo de los PAs promedio frente a la intensidades de corriente supraumbrales inyectadas, a las etapas del desarrollo P9-12 (Ba, N=27) y P16-19 (Bb, N=17). Se puede apreciar cómo en respuesta a la inyección de corriente de una misma intensidad supraumbral, la frecuencia de disparo de los PAs es significativamente menor cuando la membrana se encuentra a -80 mV con respecto de cuando se despolariza a -60 mV, tanto en las neuronas del grupo P9-12 (en el intervalo comprendido entre 0 y 130 pA) como en las del grupo P16-19 (en todo el intervalo estudiado).

-80 mV vs -60 mV, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

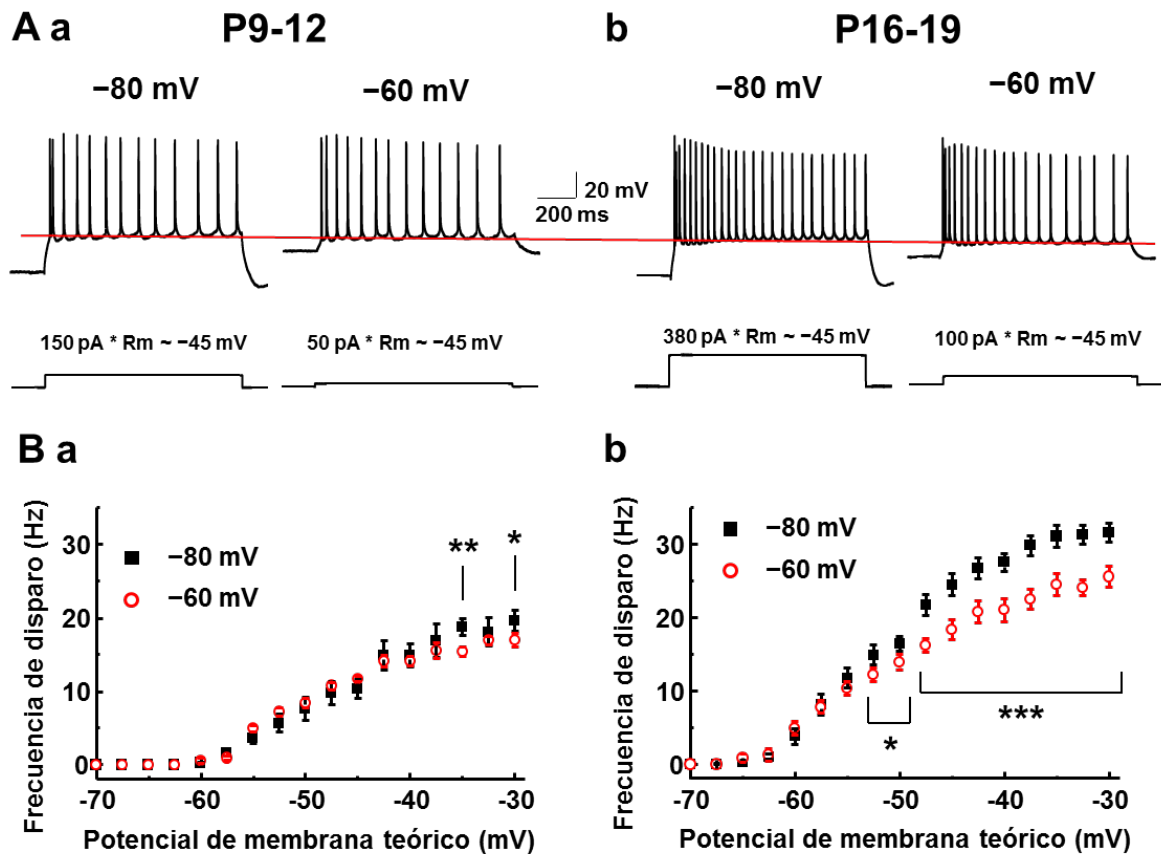


Figura R27. La plasticidad intrínseca a corto plazo disminuye la excitabilidad neuronal.

Para eliminar las diferencias debidas a la resistencia de la membrana, las curvas entrada-salida se realizaron tomando como referencia al potencial de estabilización teórico que alcanzaría la membrana para cada pulso de corriente, según la ley de Ohm.

- A)** Registros representativos de los PAs generados por pulsos cuadrados despolarizantes, de 1 s de duración tras fijar el potencial de la membrana a -80 mV o -60 mV durante 5 min, en neuronas de los grupos P9-12 (**Aa**) y P16-19 (**Ab**). La intensidad de corriente inyectada en los cuatro ejemplos fue la necesaria para alcanzar un potencial de estabilización teórico de la membrana de -45 mV. La línea roja muestra el potencial de estabilización, similar en los cuatro ejemplos.
- B)** Curva de entrada-salida que representa la frecuencia de disparo de los PAs promedio frente al potencial de estabilización teórico alcanzado, a las etapas del desarrollo P9-12 (**Ba**, N=27) y P16-19 (**Bb**, N=17). Se puede apreciar cómo la curva de entrada-salida es similar a ambos potenciales de fijación en el grupo P9-12 (las excitabilidad sólo es significativamente mayor al fijar la membrana a -80 mV con respecto de -60 mV cuando el potencial teórico es -35 mV y -30 mV), mientras que en el grupo P16-19 la excitabilidad es estadísticamente mayor a partir de un potencial de estabilización de -52,5 mV cuando se fija la membrana a -80 mV con respecto de cuando se despolariza sostenidamente.

-80 mV vs -60 mV, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

2.4.2. En respuesta a pulsos cortos.

En otra serie de experimentos, a fin de evaluar los efectos de la plasticidad intrínseca sobre la excitabilidad de las neuronas piramidales de CA1, se estudió la capacidad para generar PAs en respuesta a la inyección intrasomática por pulsos cortos de corriente. Para ello se aplicaron trenes de 10 pulsos cuadrados despolarizantes, de 5 ms de duración, con una frecuencia de 10 Hz, y usando una intensidad de corriente 1,1 veces superior a la que se definió como intensidad de corriente umbral, con el potencial de la membrana fijado en -80 mV y en -60 mV durante 5 minutos, y a los intervalos de edad postnatal de P9-12 y de P16-19 (Figura R28).

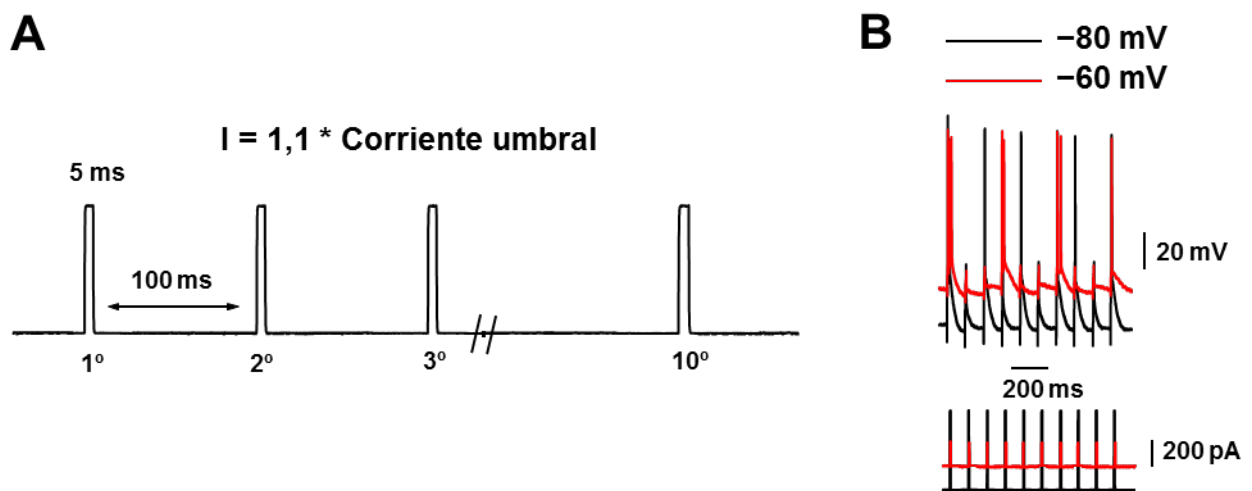


Figura R28. Protocolo para evaluar la excitabilidad en respuesta a pulsos cortos.

- A)** Diagrama del protocolo utilizado para estudiar la respuesta de la neurona a la inyección intrasomática de 10 pulsos de 5 ms de duración, a una frecuencia de 10 Hz y una intensidad 1,1 veces superior a la umbral.
- B)** Registros representativos obtenidos tras la aplicación del protocolo descrito en **A)**, tras fijar la membrana a -80 mV (negro) o a -60 mV (rojo) durante 5 minutos. Se puede observar cómo en ambos casos hay pulsos capaces de generar PAs (éxitos) y pulsos que no los generan (fracasos).

En estas condiciones no se generaron PAs en todos los pulsos. Esto se debió a la inactivación parcial de corrientes transitorias que determinan el umbral de voltaje para el disparo del PA, como la corriente transitoria de sodio o las corrientes A y D de potasio (Ma & Koester 1996; Madeja 2000; Kim et al. 2005). Para cuantificar la respuesta al tren de 10 pulsos, se consideró como éxito a todo pulso que generó un PA, y como fracaso a todo pulso que no generó PA.

Cuando se comparó la respuesta al tren de pulsos después de fijar la membrana a -80 mV o a -60 mV, se encontró un comportamiento diferente en cada grupo de edad (Figura R29; $P < 0,05$ para el factor edad). Tras fijar la membrana al potencial control de -80 mV, el número de éxitos fue similar en ambos grupos de edad (P9-12: $5,78 \pm 0,62$ éxitos, $N=24$ células; P16-19: $5,94 \pm 0,36$ éxitos, $N=16$ células; $P=0,847$). Sin embargo, mientras que en el grupo P9-12 se incrementó el número de éxitos cuando se despolarizó sostenidamente la membrana a -60 mV (-80 mV: $5,78 \pm 0,62$ éxitos; -60 mV: $7,40 \pm 0,48$ éxitos; $N=24$, $P < 0,05$), en el grupo P16-19 se redujo el número de éxitos al despolarizar la membrana (-80 mV: $5,94 \pm 0,36$ éxitos; -60 mV: $4,52 \pm 0,29$ éxitos; $N=16$, $P < 0,001$). Estos resultados encajan con los cambios plásticos observados en la velocidad de repolarización de los PAs y en el umbral de voltaje para la generación de éstos, encontrados al despolarizar sostenidamente la membrana plasmática de las neuronas pertenecientes al grupo de edad P16-19 (Sección 2.2.2).

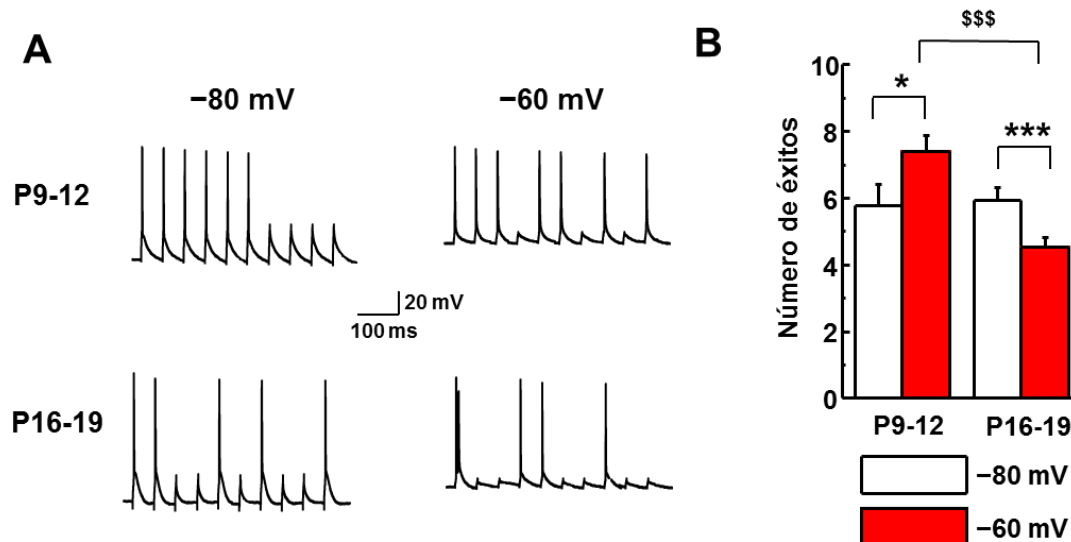


Figura R29. La plasticidad intrínseca a corto plazo disminuye la excitabilidad neuronal.

- A)** Registros representativos de los PAs generados en respuesta a 10 pulsos de 5 ms de duración, 10 Hz de frecuencia, a intensidad 1,1 veces superior a la intensidad umbral, tras fijar la membrana durante 5 min a -80 mV (izquierda) o -60 mV (derecha), en los grupos de edad P9-12 (arriba) y P16-19 (abajo).
- B)** Gráfico de barras mostrando el promedio de éxitos obtenidos con el protocolo descrito en **A)**, tras fijar la membrana a -80 mV (blanco) o -60 mV (rojo), en neuronas de los grupos de edad P9-12 (izquierda, $n=24$ células) y P16-19 (derecha, $n=16$ células). Se puede observar cómo en el grupo P9-12 aumenta el número de éxitos al despolarizar sostenidamente la membrana, mientras que en el grupo P16-19 disminuye, en comparación con el número de éxitos producidos tras fijar la membrana a -80 mV.

P9-12 vs P16-19 a -60 mV, \$\$\$ $P < 0,001$. T-Student para datos independientes.

-80 mV vs -60 mV, * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$. T-Student para datos pareados.

En resumen, la plasticidad intrínseca a corto plazo que presentan las neuronas procedentes de las ratas del grupo P16-19 disminuye la excitabilidad intrínseca en respuesta a pulsos largos y cortos tras despolarizar sostenidamente la membrana a -60 mV, en comparación con la situación control (con el potencial de la membrana fijado a -80 mV), y se manifiesta por:

- Una disminución de la frecuencia de disparo de los PAs en respuesta a la inyección intrasomática por pulsos largos de corriente que despolarizan la membrana al mismo potencial de la membrana teórico.
- Una disminución del número de pulsos capaces de generar PAs cuando se aplicó una inyección intrasomática por pulsos cortos de corriente, con una frecuencia de 10 Hz y una intensidad 1,1 veces superior al umbral de corriente.

El comportamiento observado en el grupo P16-19 sugiere que la plasticidad a corto plazo inducida es una plasticidad homeostática compensatoria que se encarga de reducir la excitabilidad intrínseca para balancear la despolarización sostenida de la membrana.

2.5. La despolarización sostenida incrementa la corriente A de potasio.

2.5.1. El bloqueante 4-aminopiridina (3 mM) bloquea la plasticidad intrínseca.

En secciones anteriores se ha demostrado la inducción de la plasticidad intrínseca a corto plazo, a partir de los 16 días de edad postnatal, en las neuronas piramidales de CA1 tras una despolarización subumbral sostenida (Sección 2.2). Además, se ha analizado el perfil temporal de su inducción y extinción (Sección 2.3) y se ha estudiado su implicación en la excitabilidad neuronal (Sección 2.4).

Una vez descritos los aspectos generales que tiene la plasticidad sobre el comportamiento intrínseco de las neuronas piramidales de CA1, se estudiaron las bases moleculares que subyacen a la generación de dicha plasticidad. En la búsqueda de las moléculas implicadas, había que tener en cuenta que la plasticidad estudiada se caracteriza por:

- Estrechar los PAs, debido a un aumento en la velocidad de repolarización (Sección 2.2.2).
- Despolarizar el umbral de voltaje para el disparo de PAs (Sección 2.2.2).
- Disminuir la excitabilidad neuronal en respuesta a la inyección de pulsos de corriente de corta y larga duración (Sección 2.4).

Los efectos que tiene la plasticidad intrínseca a corto plazo sobre la morfología del PA y sobre la excitabilidad neuronal sugieren la implicación de una corriente hiperpolarizante, dependiente de voltaje y cuya cinética de activación sea rápida. Teniendo en cuenta que la corriente tipo A de potasio es una corriente que se caracteriza por: ser transitoria y dependiente de voltaje, presentar cinéticas de activación e inactivación rápidas (Connor & Stevens 1971a; Connor & Stevens 1971b; Hille 2001; Johnston et al. 2010), activarse a potenciales de la membrana subumbrales (Klee et al. 1995; Mitterdorfer & Bean 2002; Bean 2007), contribuir a la repolarización de los PAs y modular la frecuencia de disparo (Connor & Stevens 1971a; Storm 1987; Johnston et al. 2000; Kim et al. 2005; Bourdeau et al. 2011), se consideró que podría estar implicada en la expresión de la plasticidad intrínseca a corto plazo. Por ello, se realizaron experimentos con varias técnicas electrofisiológicas para determinar el potencial papel de esta corriente sobre la plasticidad descrita.

El estudio sobre la implicación de la corriente tipo A comenzó con una serie experimentos de *patch-clamp* en fijación de corriente en rodajas de hipocampo procedentes de ratas de los grupos de edad P9-12 y P16-19. En ellos, se añadió el bloqueante de la corriente tipo A, 4-aminopiridina (4-AP, 3mM), a la solución extracelular, y se registraron los PAs generados mediante la inyección de pulsos cuadrados de corriente despolarizante, de 5 ms de duración y con una intensidad de corriente umbral, después de fijar la membrana durante 5 minutos a -80 mV o a -60 mV. Como se esperaba, los PAs registrados tras las aplicación de 4-AP 3 mM a la solución extracelular tuvieron una duración media mayor (Figura R32, $P < 0,001$ en ambos grupos de edad para la comparación control vs tras añadir 4AP 3 mM) y con menor velocidad de repolarización (Figura R32, $P < 0,001$ en ambos grupos de edad para la comparación control vs tras añadir 4AP 3 mM) que los inducidos antes de aplicar el bloqueante.

Debido al bloqueo de la corriente de potasio tipo A, el enlentecimiento de la fase de repolarización provoca, en algunas neuronas del grupo de edad P16-19, un fracaso en la repolarización debido a la aparición de espigas de calcio producidas por los canales implicados en la corriente tipo T de calcio, impidiendo la correcta medición de la duración del PA a su amplitud media (Figura R30). Para solventar este problema, en esta serie de experimentos se mide la duración del primer tercio del PA, región que no se ve afectada por las espigas de calcio cuando se administra el bloqueante de la corriente tipo A.

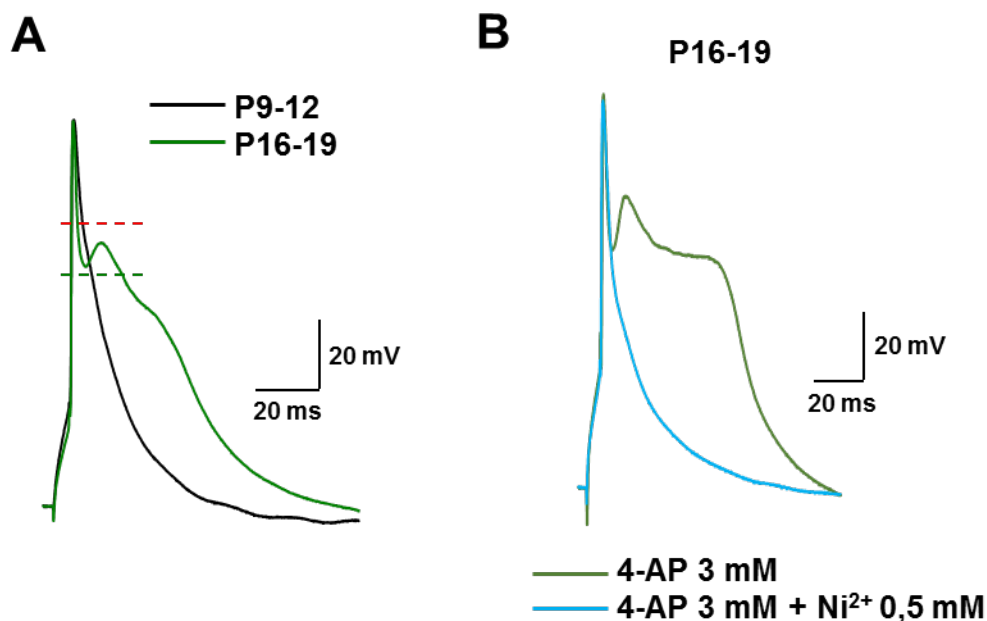


Figura R30. Fracaso en la repolarización del PA tras la aplicación de 4-AP en neuronas del grupo P16-19 por el disparo de espigas de calcio.

- A)** Registros representativos de los PAs generados tras la administración del bloqueante de la corriente tipo A, 4-AP (3 mM), en los grupos de edad P9-12 (negro) y P16-19 (verde). Se observa cómo en el grupo P16-19 hay un fracaso en la repolarización debido a la aparición de espigas de calcio. Este fracaso altera la duración medida a la amplitud media (línea discontinua verde). Sin embargo no afecta a la duración del tercio superior (línea discontinua roja).
- B)** Registros representativos de los PAs generados en el grupo de edad P16-19 tras la administración de 4-AP 3mM (verde) y tras añadir el bloqueante de la corriente tipo T de calcio, níquel (0,5 mM, azul). Se observa cómo la aplicación de níquel bloquea la aparición de las espigas de calcio.

En el grupo P9-12, el cual aún no ha desarrollado la plasticidad, los PAs generados antes de administrar el bloqueante tienen mayor duración en el tercio superior ($37,86 \pm 4,52$ % más anchos, $P < 0,001$) y con menor velocidad de repolarización ($22,00 \pm 3,29$ % más lenta, $P < 0,001$) cuando se inducen tras despolarizar sostenidamente la membrana, con respecto de cuando se fija la membrana a -80 mV (Figuras R31A y R32A). Este resultado es consistente con la inactivación de canales por despolarización (entre ellos, los canales implicados en la corriente de potasio tipo A). Después de añadir 4-AP, los PAs tuvieron una misma duración en el tercio superior ($4,44 \pm 5,14$ % más anchos, $P = 0,408$) e igual velocidad de repolarización ($4,39 \pm 4,91$ % más lenta, $P = 0,403$) que los dos potenciales estudiados (Figuras R31A y R32A), debido a que los canales implicados en la corriente tipo A (que en ausencia de bloqueante estarían cerrados y serían susceptibles de activarse cuando la membrana se encuentra fijada a -80 mV, y con un porcentaje elevado de canales inactivos al despolarizar sostenidamente la membrana a -60 mV) se encuentran bloqueados.

En el grupo P16-19, antes de añadir 4-AP a la solución extracelular, los PAs tienen menor duración en el tercio superior ($2,49 \pm 0,99$ % más estrechos, $P < 0,05$) y mayor velocidad de repolarización ($10,23 \pm 2,16$ % más rápida, $P < 0,001$) cuando se generan tras despolarizar la membrana a -60 mV durante 5 minutos con respecto de cuando se generan tras fijar la membrana a -80 mV (Figura R31B y R32B) debido a la expresión de la plasticidad intrínseca a corto plazo. Tras añadir 4-AP (3 mM), los PAs tienen la misma duración ($1,93 \pm 1,33$ % más anchos, $P = 0,178$) y velocidad de repolarización ($0,50 \pm 3,01$ % más lenta, $P = 0,871$) que los dos potenciales estudiados (Figura R31B y R32B), resultado similar al encontrado en las neuronas del grupo P9-12. Por tanto, la administración extracelular del bloqueante de la corriente tipo A, 4-AP 3 mM, bloquea la plasticidad en las neuronas que la expresaban.

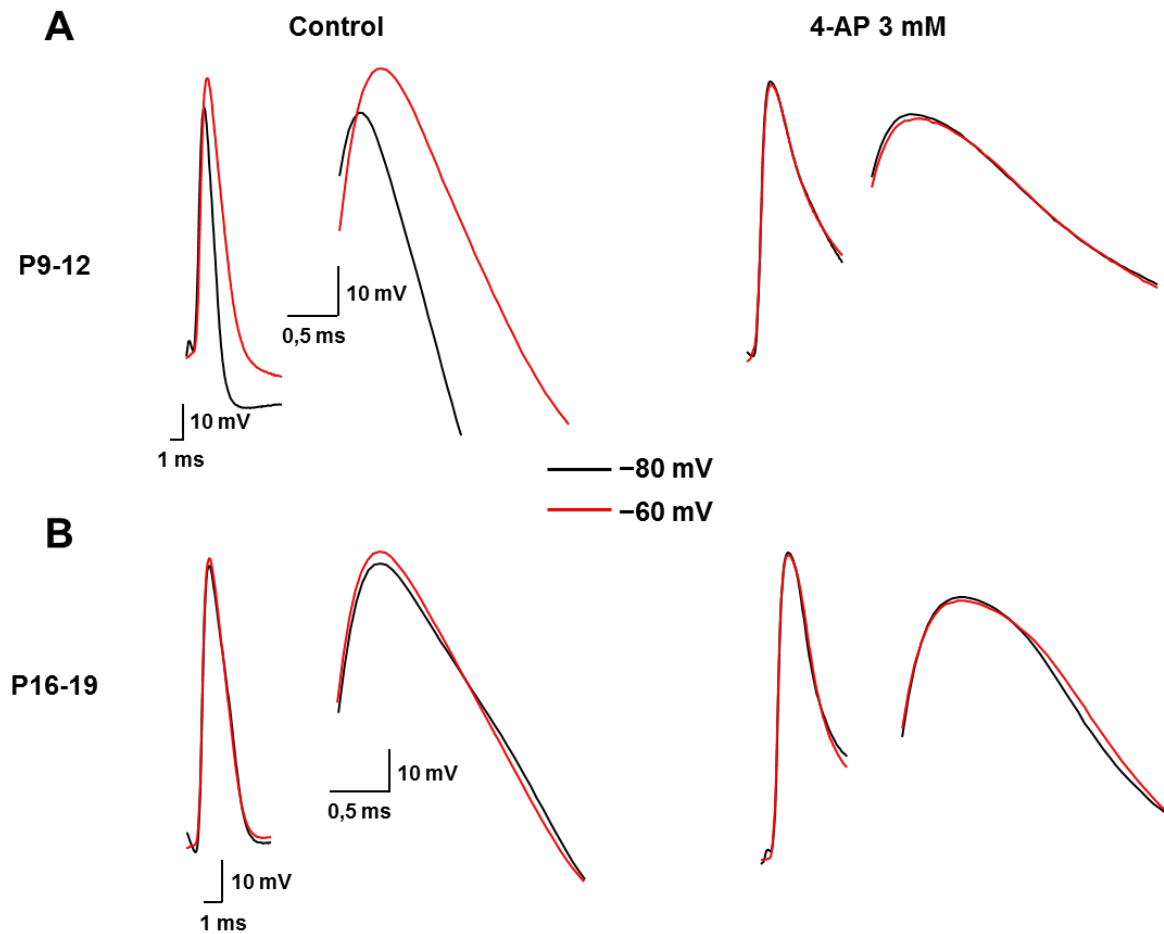


Figura R31: La aplicación de 4-AP a la solución extracelular bloquea la plasticidad intrínseca a corto plazo.

Control) Registros representativos de los PAs generados tras fijar la membrana a -80 mV (negro) o a -60 mV (rojo) durante 5 minutos. A la derecha de cada PA se muestra ampliada la fase repolarizante. Se aprecia cómo en el grupo P9-12 (**A , izquierda**) el PA se ensancha al despolarizar sostenidamente la membrana con respecto al obtenido tras fijar la membrana a -80 mV. Por el contrario, en el grupo P16-19 (**B, izquierda**) el PA generado a -60 mV tiene una menor duración que a -80 mV, al presentar la plasticidad intrínseca a corto plazo.

4-AP) Registros representativos de los PAs generados tras la aplicación de 4-AP (3 mM) al medio extracelular tras fijar la membrana a -80 mV (negro) o a -60 mV (rojo) durante 5 minutos. Se observa cómo tras bloquear la corriente tipo A desaparecen las diferencias en la fase de repolarización debidas a la inactivación parcial de estos canales (**A, derecha**) o al bloqueo de la expresión de la plasticidad intrínseca a corto plazo (**B, derecha**).

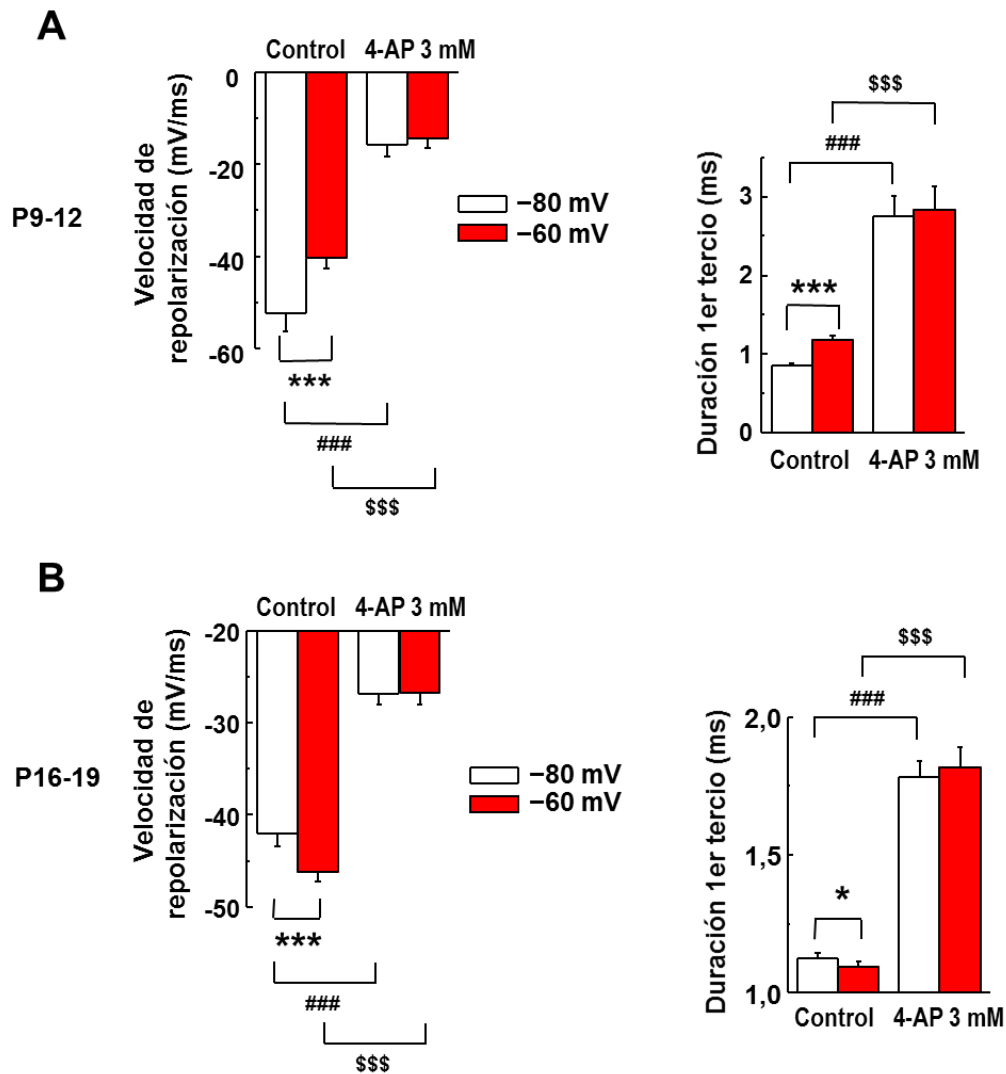


Figura R32: La aplicación de 4-AP bloquea la plasticidad de la excitabilidad intrínseca a corto plazo.

- A)** Gráficas de barras representando los valores promedio de la velocidad de repolarización (**izquierda**) y la duración del tercio superior (**derecha**) en neuronas procedentes del grupo de edad P9-12. Se puede apreciar cómo al añadir 4-AP, disminuye la velocidad de repolarización y aumenta la duración de los PAs a ambos potenciales de fijación. Además, desaparecen las diferencias en la velocidad de repolarización y duración al primer tercio debidas a la inactivación parcial de los canales implicados en la corriente tipo A tras la despolarización de la membrana.
- B)** Gráficas de barras representando los valores promedio de la velocidad de repolarización (**izquierda**) y la duración del tercio superior (**derecha**) en neuronas procedentes del grupo de edad P16-19. Se observa cómo al añadir 4-AP, disminuye la velocidad de repolarización y se aumenta la duración de los PAs generados. Además, tras la aplicación de 4-AP, se bloquea la expresión de la plasticidad intrínseca a corto plazo.

-80 mV vs -60 mV, * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$.

Control vs 4-AP a -80 mV, ### $P < 0,001$.

Control vs 4-AP a -60 mV, \$\$\$ $P < 0,001$.

2.5.2. La plasticidad intrínseca a corto plazo afecta a la corriente tipo A aislada por prepulso de inactivación.

Para estudiar con más detalle la posible implicación de la corriente tipo A de potasio en la plasticidad, se realizó una nueva serie de experimentos de *patch-clamp*, esta vez en modo de fijación de voltaje, en neuronas del grupo de edad P16-19 (el cual presenta la plasticidad), con el fin de aislar la corriente. Como se mencionó previamente, la corriente de potasio tipo A es una corriente transitoria de salida dependiente de voltaje, activada a potenciales de la membrana subumbrales (Klee et al. 1995; Mitterdorfer & Bean 2002; Bean 2007) y con cinéticas de activación e inactivación rápidas (Connor & Stevens 1971a; Hille 2001; Johnston et al. 2010). Debido a estas propiedades, para estudiar la corriente tipo A es importante optimizar la preparación con el fin de fijar la mayor superficie neuronal posible al potencial de la membrana deseado (Carter et al. 2012). Para ello, los registros de fijación de voltaje se realizaron sobre neuronas piramidales de CA1 previamente disociadas.

La corriente tipo A generada tras fijar la membrana a -80 mV y a -60 mV se aisló:

- 3º. Farmacológicamente, se bloquearon las corrientes de sodio dependientes de voltaje y la corriente de calcio de alto umbral tipo L mediante la aplicación a la solución extracelular de los bloqueantes específicos, tetrodotoxina (TTX, $0.5 \mu\text{M}$) y nifedipina ($10 \mu\text{M}$) respectivamente, a la solución extracelular.
- 4º. Electrofisiológicamente, se aisló la corriente tipo A aprovechando su rápida cinética de inactivación mediante el siguiente protocolo, adaptado de Jung y Hoffman (Jung & Hoffman 2009)(Figura R33A): Partiendo del potencial basal (-80 mV o -60 mV), se midió la corriente de salida generada por un pulso de voltaje test de 1,5 segundos de duración que despolarizó la membrana a $+40$ mV. El pulso test fue precedido de:
 - Un prepulso de voltaje de 150 ms que hiperpolarizó la membrana a -120 mV. En estas condiciones el pulso test generó una corriente de salida con dos componentes cinéticos de inactivación: uno rápido, producido por la corriente tipo A, y otro lento, en el que estaban implicadas el resto de corrientes de potasio.
 - Un prepulso de voltaje de 150 ms que despolarizó la membrana a -20 mV, inactivando las corrientes transitorias (Connor & Stevens 1971a; Connor & Stevens 1971b; Numann et al. 1987; Klee et al. 1995; Mitterdorfer & Bean 2002). En estas condiciones, el pulso test generó una corriente de salida de

inactivación lenta, debido a que se inactivaron la mayoría de los canales implicados en la corriente tipo A.

Sustrayendo la corriente generada con el prepulso que despolarizó la membrana a -20 mV de la generada tras hiperpolarizar la membrana a -120 mV, quedó aislada la corriente tipo A (Figura R33B).

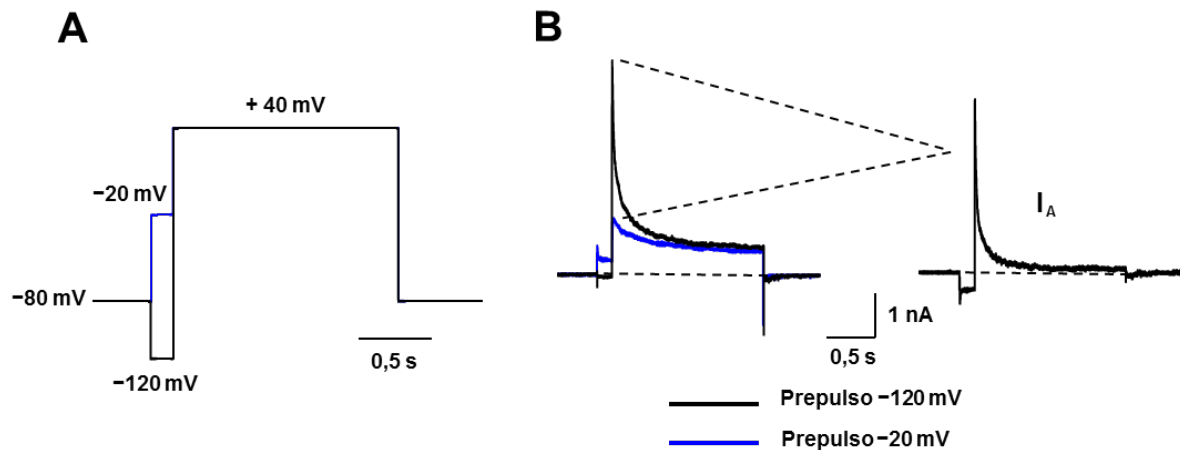


Figura R33: Protocolo utilizado para aislar la corriente tipo A (I_A) de potasio mediante un prepulso de inactivación.

- A)** Diagrama del protocolo utilizado para aislar la corriente tipo A mediante un prepulso de inactivación (azul), a fin de poder sustraer dicha corriente de otras corrientes de potasio a fijación de voltaje de -80 mV.
- B)** Registro representativo de cómo se aísla la corriente tipo A (derecha). La I_A se obtiene sustrayendo la corriente obtenida tras el prepulso de -20 mV (izquierda, trazo azul), de aquellas generadas desde -120 mV que contienen todas las corrientes de potasio (izquierda, trazo negro). La línea discontinua representa la línea base, la cual queda como referencia de intensidad de corriente ($I=0$) al sustraer los registros.

Siguiendo este protocolo, el pico de corriente tipo A obtenido tras fijar la membrana a -60 mV es estadísticamente mayor que el obtenido cuando se fija la membrana a -80 mV (Figura R34B; -80 mV: $4,22 \pm 0,24$ nA; -60 mV: $5,12 \pm 0,30$ nA, $N=11$ células, $P<0,001$).

Además, la constante de tiempo de inactivación de la I_A es más lenta cuando se fija la membrana a -60 mV, con respecto de cuando se fija a -80 mV (Figura R34C; -80 mV: $53,0 \pm 5,3$ ms; -60 mV: $63,9 \pm 7,3$ ms, $N=11$ células, $P<0,001$).

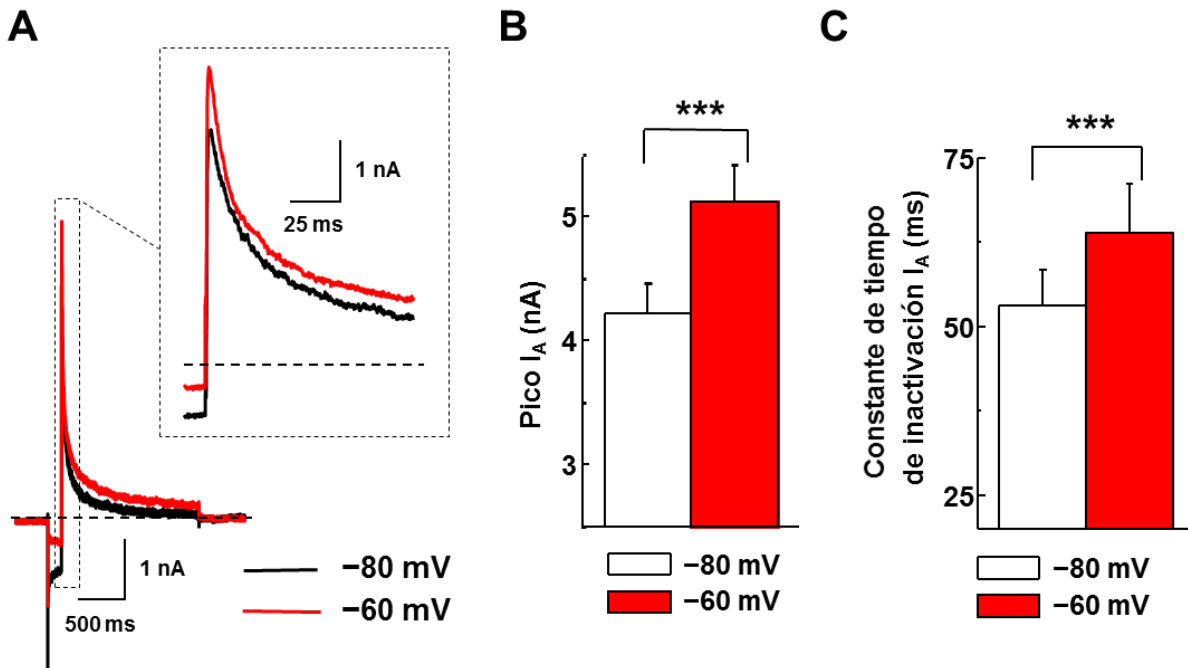


Figura R34: La plasticidad de la excitabilidad intrínseca a corto plazo incrementa la corriente tipo A de potasio.

- A) Registros representativos de la corriente tipo A aislada mediante el protocolo de la Figura R33, generados tras fijar la membrana a -80 mV (negro) o -60 mV (rojo) durante 5 minutos. A la derecha se incluye una ampliación del intervalo correspondiente al pico de corriente. La línea discontinua representa el cero de intensidad de corriente tras sustraer los registros. Todos los registros corresponden a neuronas del grupo P16-19
- B) Gráfico de barras que representa los valores promedios de la máxima intensidad de corriente tipo A en neuronas del grupo P16-19. Se observa cómo el pico de corriente es mayor cuando se fija el potencial de la membrana a -60 mV, con respecto a -80 mV. $N=11$ células.
- C) Gráfico de barras que representa los valores promedios de la constante tiempo de inactivación de la corriente tipo A en neuronas del grupo de edad P16-19. Se observa cómo la constante de tiempo es mayor cuando se fija el potencial de la membrana a -60 mV, con respecto a -80 mV. $N=11$ células.

-80 mV vs -60 mV, *** $P < 0,001$.

Por tanto, los experimentos en fijación de corriente con el bloqueante 4AP (3 mM), y en fijación de voltaje con la corriente aislada, sugieren que la corriente tipo A de potasio está implicada en la expresión de la plasticidad intrínseca a corto plazo descrita.

2.6. La inducción de la plasticidad intrínseca requiere el calcio que entra por los canales de calcio tipo T.

2.6.1. La inducción de la plasticidad intrínseca es dependiente de calcio.

Una vez identificado que la corriente tipo A de potasio es una corriente implicada en la expresión de la plasticidad de la excitabilidad intrínseca a corto plazo, el siguiente paso consiste en estudiar qué mecanismos moleculares producen el incremento de la corriente tipo A en respuesta a una despolarización sostenida en las neuronas del grupo de edad P16-19.

El calcio está implicado en casi todas las formas de plasticidad a corto y largo plazo descritas, tanto sinápticas (Katz & Miledi 1968; Lynch et al. 1983; Malenka et al. 1988; Dudek & Bear 1992; Zucker & Regehr 2002) como intrínsecas (Aizenman & Linden 2000; Fan et al. 2005; Grubb & Burrone 2010; O’Leary et al. 2010). Por ello, se examinó la posible implicación del calcio en la plasticidad descrita mediante experimentos de *patch-clamp* en fijación de corriente, en los que se inyectaron en los somas diferentes quelantes de calcio disueltos en las soluciones intracelulares a través de la pipeta de *patch*.

En una primera serie de experimentos se analizó la morfología de los PAs generados mediante la inyección de pulsos cuadrados despolarizantes, de 5 ms de duración y de intensidad de corriente umbral, tras fijar la membrana durante 5 minutos a -80 mV o a -60 mV.

En presencia del quelante EGTA (ácido etilen glicol-bis (2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético), tanto en baja (1 mM) como en alta concentración (10 mM), se pudieron observar los efectos de la plasticidad intrínseca sobre los parámetros de los PAs generados tras despolarizar la membrana durante 5 minutos a -60 mV (Figura R35; EGTA 1 mM, N=16 células: la velocidad de repolarización es un $5,52 \pm 1,76$ % más rápida, $P < 0,01$, y la duración media un $3,09 \pm 0,59$ % menor, $P < 0,001$, en los PAs generados a -60 mV, con respecto de los generados a -80 mV; EGTA 10 mM, N=24 células: la velocidad de repolarización es un $10,95 \pm 1,83$ % más rápida, $P < 0,001$, y la duración media un $6,37 \pm 1,04$ % menor, $P < 0,001$, en los PAs generados a -60 mV con respecto de los generados a -80 mV).

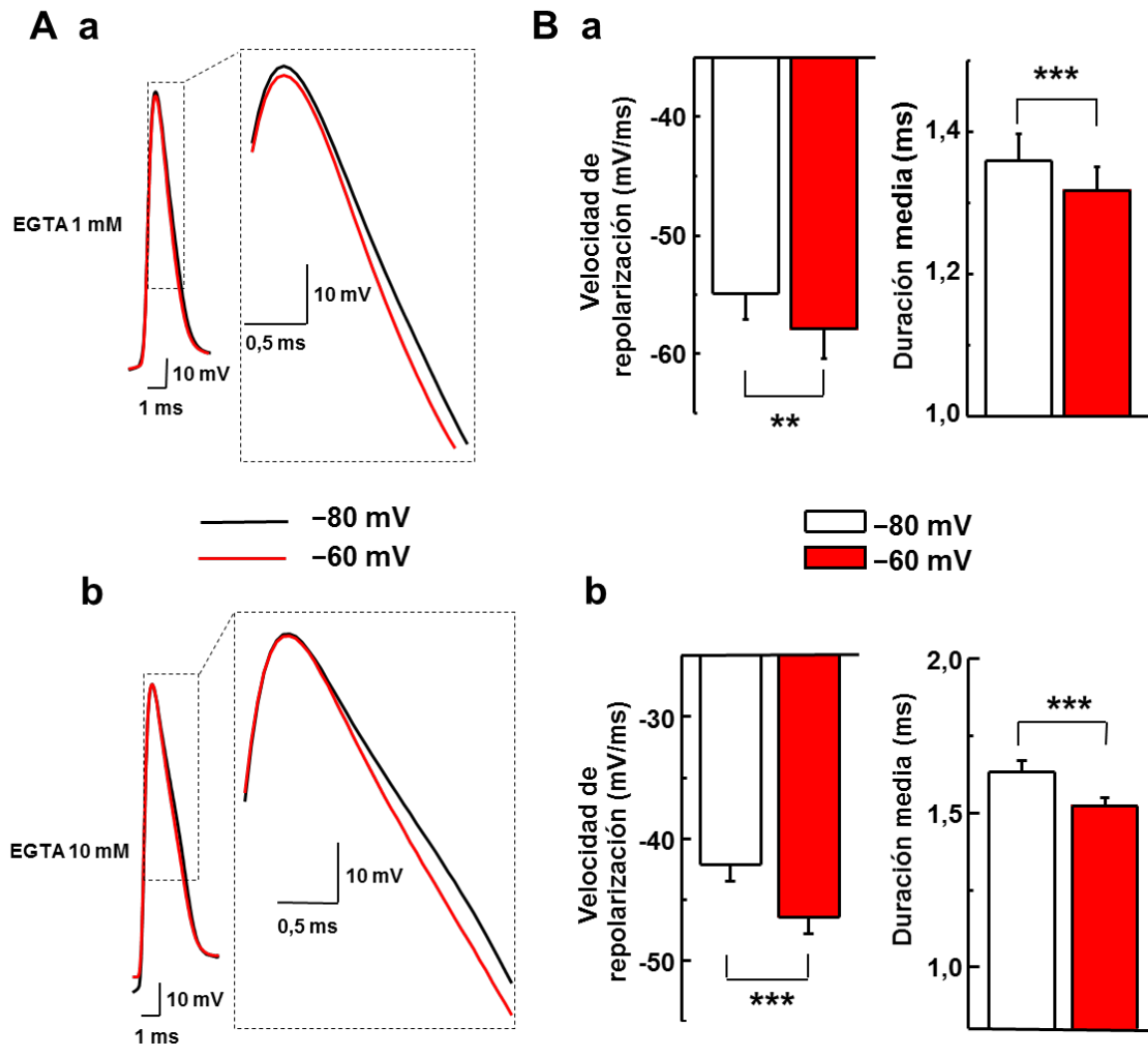


Figura R35: El EGTA intracelular no bloquea los efectos de la plasticidad de la excitabilidad intrínseca a corto plazo sobre la morfología de los PAs.

- A)** Registros representativos de PAs generados mediante un pulso de 5 ms de duración, a intensidad umbral, en neuronas del grupo P16-19, generados tras fijar la membrana a -80 mV (negro) o a -60 mV (rojo) durante 5 minutos y en presencia de 1 mM (Aa) o 10 mM (Ab) de EGTA intracelular. A la derecha se incluye una ampliación de la fase repolarizante.
- B)** Gráficos de barras en los que se puede apreciar cómo 1 mM (**Ba**, N=16 células) ó 10 mM (**Bb**, N=24 células) de EGTA intracelular no bloquea la plasticidad. Los PAs tienen mayor velocidad de repolarización (izquierda) y menor duración media (derecha) cuando son generados tras fijar el potencial de la membrana a -60 mV (rojo) con respecto de los obtenidos tras fijar la membrana a -80 mV (blanco).

-80 mV vs -60 mV, ** P < 0,01, *** P < 0,001.

Algunos autores describieron plasticidades intrínsecas dependientes de calcio en las que la fuente de calcio se encontraba próxima al sensor de calcio responsable de la plasticidad (Wu et al. 2008; Anderson et al. 2010a). En estas situaciones en las que la acción del calcio se encuentra en el mismo nanodominio, el EGTA no tiene efecto debido a que su constante de velocidad para la unión de calcio es lenta, pero un quelante como el BAPTA, (ácido 1,2-bis(o-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético) cuya constante de velocidad para la unión del calcio es 150 veces más rápida que la del EGTA, sí bloquea el efecto del calcio (Naraghi & Neher 1997; Fakler & Adelman 2008). En el presente estudio, la aplicación de BAPTA (10 mM) a la solución intracelular bloquea los efectos de la plasticidad sobre los parámetros estudiados en los PAs generados tras despolarizar sostenidamente la membrana (Figura R36; la velocidad de repolarización es un $4,08 \pm 1,63$ % más lenta, $P < 0,05$, y la duración media un $3,94 \pm 1,63$ % mayor, $P < 0,05$, en los PAs generados a -60 mV con respecto de los generados a -80 mV).

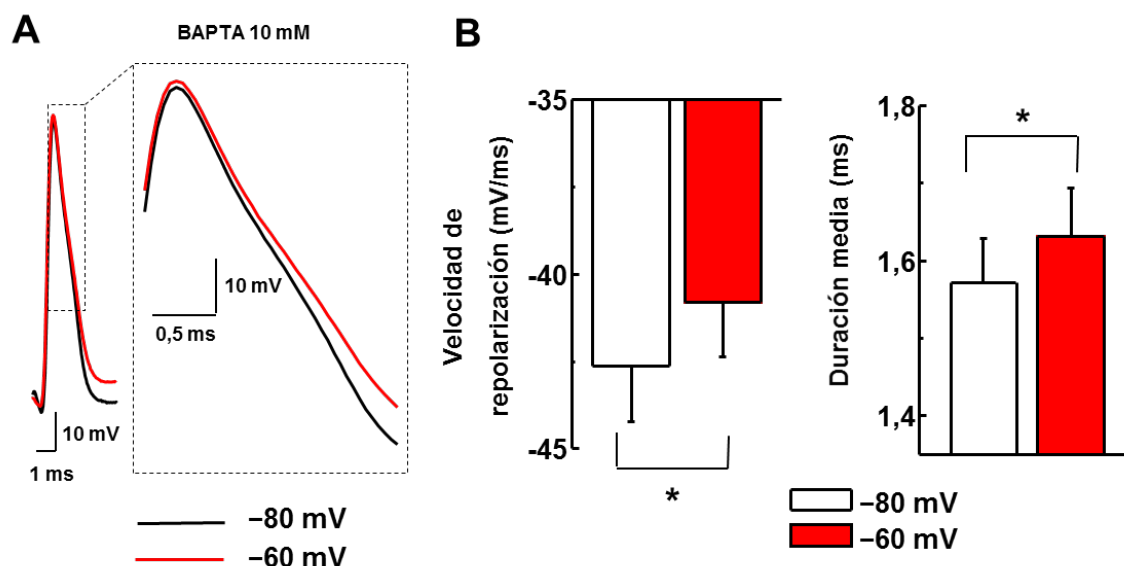


Figura R36: El BAPTA intracelular bloquea los efectos de la plasticidad de la excitabilidad intrínseca a corto plazo sobre la morfología de los PAs.

- A)** Registro representativo de 1 PA generado mediante un pulso de 5 ms a intensidad umbral tras fijar la membrana a -80 mV (negro) o -60 mV (rojo) durante 5 minutos, con BAPTA intracelular (10 mM) en una neurona del grupo P6-19. A la derecha se incluye una ampliación de la fase repolarizante.
- B)** Gráficos de barras en los que se puede apreciar cómo el BAPTA intracelular (10 mM) bloquea la plasticidad de la excitabilidad intrínseca a corto plazo. Los PAs tienen menor velocidad de repolarización (izquierda) y mayor duración media (derecha) cuando son generados tras fijar el potencial de la membrana a -60 mV (rojo) con respecto de los obtenidos tras fijar la membrana a -80 mV (blanco). N= 18 células.

-80 mV vs -60 mV, * $P < 0,05$.

Posteriormente se evaluó, a ambos potenciales de fijación, la excitabilidad neuronal en respuesta a la inyección de pulsos cuadrados de corriente despolarizante, de 1 segundo de duración e intensidad variable, en presencia de EGTA (10 mM) o de BAPTA (10 mM) en la solución intracelular. Mediante una curva de entrada-salida en la que se representó la frecuencia de disparo de los PAs frente al potencial teórico de la membrana alcanzado según la ley de Ohm, se comprobó que mientras la presencia de EGTA en la solución intracelular no afecta a la plasticidad intrínseca a corto plazo descrita, de modo que la excitabilidad neuronal disminuye al despolarizar sostenidamente el potencial de la membrana (Figura R37Aa y R37Ba; $P < 0,001$ para el factor potencial de fijación), la aplicación de BAPTA en la solución intracelular bloquea la plasticidad intrínseca a corto plazo descrita, pues no cambia la excitabilidad neuronal tras despolarizar sostenidamente el potencial de la membrana (Figura R37Ab y R37Bb; $P = 0,575$ para el factor potencial de fijación).

Por último, se evaluó, tras fijar el potencial de la membrana a -80 mV y a -60 mV durante 5 minutos, la excitabilidad neuronal en respuesta a trenes de 10 pulsos cuadrados de corriente despolarizante, con una frecuencia de 10 Hz, de 5 milisegundos de duración e intensidad 1,1 veces superior a la que se consideró como intensidad umbral, en presencia de EGTA (10 mM) o de BAPTA (10 mM) en la solución intracelular. Mientras que en presencia de EGTA intracelular, el número de éxitos en respuesta al tren de pulsos de corriente es estadísticamente menor cuando se despolarizó sostenidamente la membrana, con respecto de cuando se fijó la membrana a -80 mV (Figura R38Aa y R38Ba; -80 mV: $5,94 \pm 0,36$ éxitos; -60 mV: $4,52 \pm 0,29$ éxitos; $N = 16$; $P < 0,001$), con BAPTA intracelular se bloquea la plasticidad intrínseca a corto plazo descrita, ya que el número de éxitos es mayor al despolarizar sostenidamente la membrana, aunque sin llegar a existir diferencias estadísticamente significativas (Figura R38Ab y R38Bb; -80 mV: $4,73 \pm 0,75$ éxitos; -60 mV: $5,52 \pm 0,58$ éxitos; $N = 9$; $P = 0,093$).

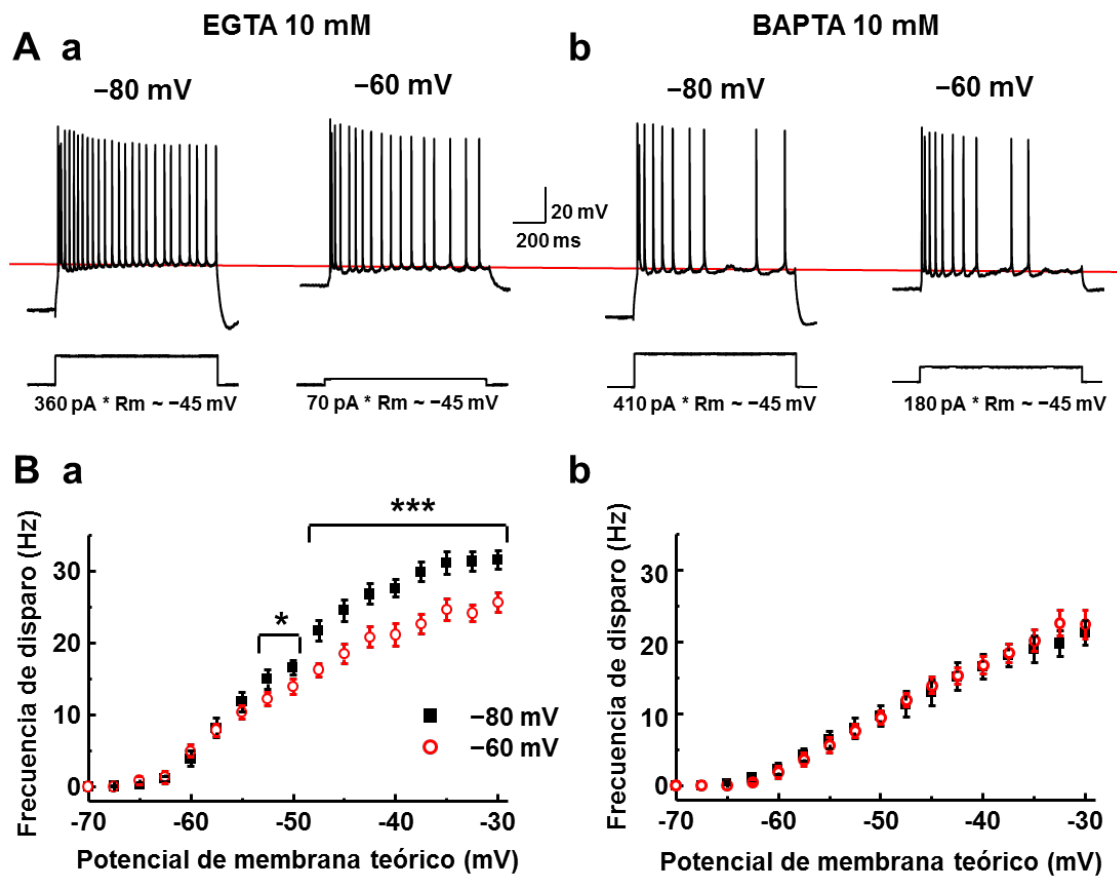


Figura R37: La aplicación de BAPTA a la solución intracelular bloquea los efectos de la plasticidad de la excitabilidad intrínseca a corto plazo sobre la excitabilidad neuronal.

- A)** Registros representativos de los PAs generados por pulsos de 1 segundo, tras fijar el potencial de la membrana durante 5 minutos a -80 mV o a -60 mV, rellenas con EGTA (10 mM) (Aa) o BAPTA intracelular (10 mM) (Ab) a neuronas del grupo P16-19. La intensidad de corriente inyectada en los cuatro ejemplos fue la necesaria para alcanzar un potencial de estabilización teórico de la membrana de -45 mV. La línea roja muestra el potencial de estabilización, similar en los cuatro ejemplos.
- B)** Curvas de entrada-salida que representan la frecuencia de disparo de los PAs promedio frente al potencial de estabilización teórico alcanzado, en neuronas del grupo P16-19, tras fijar el potencial de la membrana a -80 mV (cuadrados negros) o a -60 mV (círculos rojos) durante 5 min. Se puede apreciar que las neuronas que contienen EGTA (**Ba**, $N=17$ células), presentan una excitabilidad estadísticamente mayor a partir de un potencial de estabilización de $-52,5$ mV cuando se fija la membrana a -80 mV con respecto a -60 mV. Sin embargo, el BAPTA (**Bb**, $N=9$ células) bloquea la plasticidad, manteniendo la misma frecuencia de disparo de los PAs independientemente del potencial al que se encuentra la membrana.

-80 mV vs -60 mV, * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$.

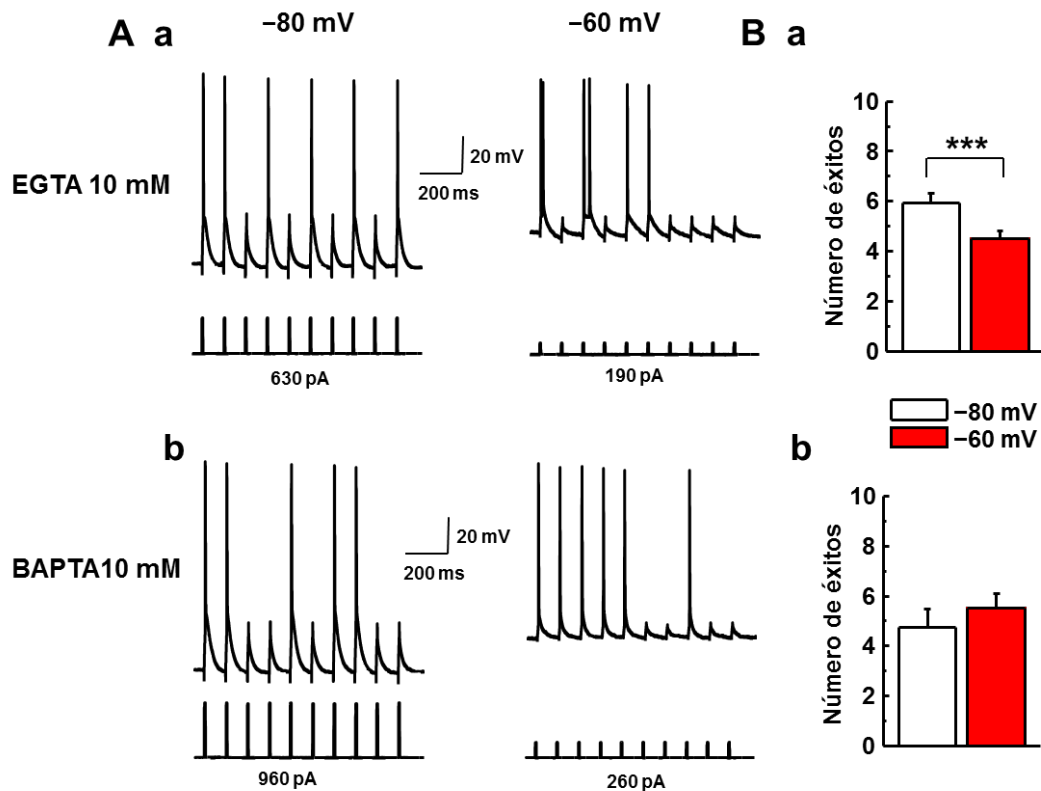


Figura R38. La aplicación de BAPTA a la solución intracelular bloquea los efectos de la plasticidad de la excitabilidad intrínseca a corto plazo sobre la excitabilidad neuronal.

- A)** Registros representativos de los PAs generados en respuesta a 10 pulsos despolarizantes de 5 ms de duración, 10 Hz de frecuencia, a intensidad 1,1 veces superior a la intensidad umbral, tras fijar la membrana durante 5 minutos a -80 mV (izquierda) o -60 mV (derecha), rellenas con una solución intracelular que contiene EGTA 10 mM (**Aa**) o BAPTA 10 mM (**Ab**), en neuronas del grupo P16-19.
- B)** Gráfico de barras comparando el promedio de éxitos obtenidos con el protocolo descrito en **A**), tras fijar la membrana a -80 mV (blanco) o -60 mV (rojo), en neuronas del grupo de edad P16-19. Se puede observar que al añadir EGTA 10 mM (**Ba**, N=16 células) a la solución intracelular, el número de éxitos es estadísticamente menor cuando se fija la membrana a -60 mV, con respecto a -80 mV. Sin embargo, al añadir BAPTA 10 mM (**Bb**, N=9 células), no hay diferencias estadísticamente significativas en el número de éxitos (aunque sí cierta tendencia a un mayor número de éxitos cuando se fija la membrana a -60 mV, $P=0,093$).

-80 mV vs -60 mV, *** $P < 0,001$.

En todos los experimentos realizados, tanto sobre la morfología del PA como sobre la excitabilidad neuronal, se demuestra un bloqueo de la plasticidad por BAPTA, pero no por EGTA. Estos resultados sugieren que la inducción de plasticidad intrínseca a corto plazo inducida tras despolarizar sostenidamente la membrana es dependiente de calcio, y su sensor debe estar próximo a la fuente de entrada de calcio.

2.6.2. La inducción de la plasticidad intrínseca no es dependiente de receptores NMDA.

Dado que la plasticidad intrínseca estudiada es dependiente de calcio, se planteó estudiar la fuente de calcio. La proximidad entre la fuente y el sensor de calcio descartaría que el calcio procediera de almacenes intracelulares, en cuyo caso el EGTA lo hubiera quelado (Zucker & Regehr 2002). Por tanto, el calcio debe proceder de la solución extracelular.

La plasticidad intrínseca a corto plazo se induce al despolarizar sostenidamente la membrana plasmática. Por ello, es muy probable que la fuente de calcio fuera un canal dependiente de voltaje permeable a dicho ion. Una posible fuente sería el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA). Estos receptores de glutamato, localizados en la densidad postsináptica de las dendritas, tienen un canal catiónico permeable al calcio, al sodio y al potasio, y es dependiente de voltaje debido al ion magnesio que lo bloquea a potenciales de reposo (Hille 2001). Diversos trabajos han demostrado que los canales implicados en la corriente tipo A de potasio también tienen una importante expresión en dendritas (Hoffman et al. 1997; Johnston et al. 2000; Beck & Yaari 2008). Además, se ha observado que el calcio que fluye por los receptores NMDA modula la expresión de los canales implicados en la corriente tipo A (Kim et al. 2007), y la actividad de otros canales de potasio como los SK (Ngo-Anh et al. 2005) o los HCN (Fan et al. 2005). Por tanto, los receptores NMDA podrían ser las moléculas implicadas en el influjo del calcio necesario para la inducción de la plasticidad. Sin embargo, considerando que en las condiciones de registro utilizadas la actividad sináptica basal de las rodajas era muy baja, y que la plasticidad descrita se inducía a potenciales subumbrales (si bien es cierto que probablemente no estuviera bien controlada la fijación del potencial de la membrana a nivel dendrítico), no se esperaba que los receptores NMDA participaran en la inducción de la plasticidad intrínseca a corto plazo.

Para evaluar su participación, se analizó la morfología de los PAs generados por neuronas del grupo de edad P16-19 mediante la inyección de pulsos cuadrados despolarizantes, de 5 milisegundos de duración y de intensidad de corriente umbral, tras fijar la membrana durante 5 minutos a -80 mV y a -60 mV, en presencia del bloqueante de los receptores NMDA, D-2-amino-5-fosfonopentanoato (AP5, $50 \mu\text{M}$), en la solución extracelular. La aplicación al medio extracelular de AP5 no afecta a la capacidad de las neuronas para expresar la plasticidad intrínseca a corto plazo descrita, generando PAs con una menor duración media y una mayor velocidad de repolarización cuando se despolarizó la membrana a -60 mV durante 5 minutos (Figura R39; la velocidad de repolarización fue un $8,19 \pm 1,25$ %

más rápida, $P < 0,001$, y la duración media un $4,21 \pm 1,03$ % menor, $P < 0,001$, en los PAs generados a -60 mV con respecto de los generados a -80 mV; $N=18$ células).

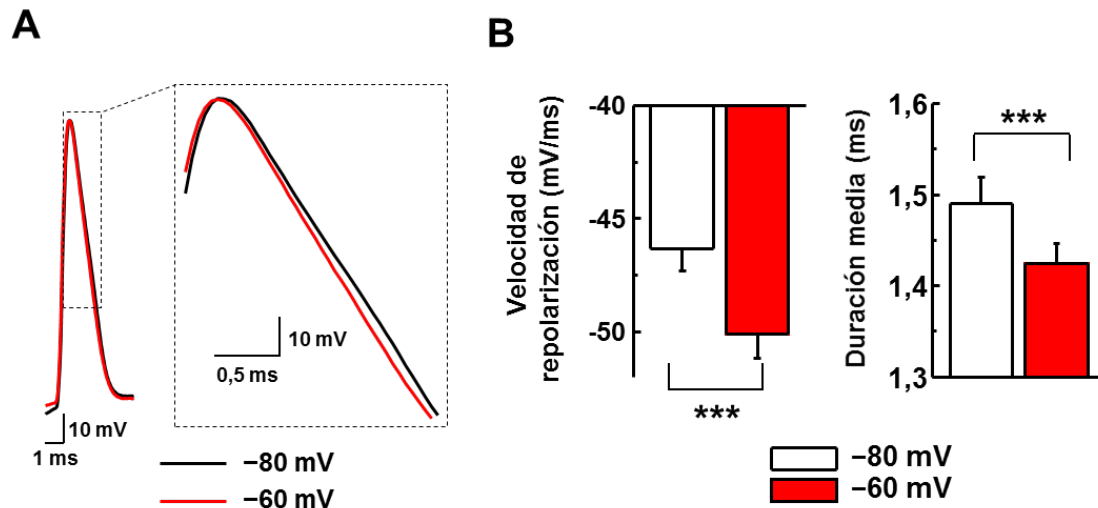


Figura R39. El calcio que ingresa por los receptores NMDA no está implicado en la inducción de la plasticidad intrínseca a corto plazo.

- A)** Registros representativos de los PAs generados en respuesta a un pulso de corriente de 5 ms de duración a intensidad umbral, tras fijar el potencial de la membrana durante 5 minutos a -80 mV (negro) o -60 mV (rojo), en presencia del bloqueante de los receptores NMDA, AP5 ($50 \mu\text{M}$), en la solución extracelular, a neuronas del grupo P16-19.
- B)** Gráfico de barras del promedio de la velocidad de repolarización (izquierda) y duración media (derecha) de los PAs registrados en presencia de AP5 ($50 \mu\text{M}$). Se puede apreciar que en presencia de AP5 no se bloquean los efectos de la plasticidad sobre la morfología de los PAs, puesto que estos tienen una menor duración media y una mayor velocidad de repolarización cuando se generan tras despolarizar la membrana durante 5 minutos a -60 mV (rojo), con respecto a -80 mV (negro). $N= 18$ células.

-80 mV vs -60 mV, *** $P < 0,001$.

2.6.3. La inducción de la plasticidad intrínseca se debe al calcio que ingresa por los canales tipo T.

Una vez descartada la implicación de los receptores NMDA, se planteó el papel de los canales de calcio dependientes de voltaje como la fuente de calcio más probable. Y de entre ellos, se estudió la posible participación de la familia de los canales Cav3, implicados en la corriente T de calcio. A diferencia del resto de corrientes de calcio dependientes de voltaje, la corriente T puede activarse a potenciales de la membrana próximos al potencial de la membrana en reposo (Perez-Reyes 2003). Para evaluar la posible inducción de la plasticidad mediante la entrada de calcio a través de los canales implicados en la corriente T, se realizaron registros de *patch-clamp* en fijación de corriente en rodajas de hipocampo procedentes de ratas del grupo P16-19.

En una primera serie de experimentos se analizó la morfología de los PAs generados mediante la inyección de pulsos cuadrados despolarizantes, de 5 ms de duración a intensidad de corriente umbral, tras fijar la membrana durante 5 minutos a -80 mV o a -60 mV, en presencia del bloqueante de los canales T, níquel ($500 \mu\text{M}$), en la solución extracelular. En estas condiciones, se bloquea la plasticidad intrínseca a corto plazo descrita sobre la morfología de los PAs tras despolarizar sostenidamente la membrana (Figura R40A y R40B; la velocidad de repolarización fue un $5,63 \pm 1,11$ % más lenta, $P < 0,001$, y la duración media un $5,47 \pm 1,05$ % mayor, $P < 0,001$, en los PAs generados a -60 mV con respecto de los generados a -80 mV; $N = 18$ células).

A fin de analizar el perfil temporal de la inducción de la plasticidad, se diseñó otro set de experimentos en la situación control y tras la adición de níquel ($500 \mu\text{M}$) en la solución extracelular, siguiendo el protocolo descrito en la sección 2.3.1. Tomando como referencia el parámetro de la duración media de los PAs, se pudo observar cómo el perfil temporal de la situación control fue similar al descrito en la sección 2.3.1: sólo fue el PA estadísticamente más ancho cuando el tiempo de despolarización fue de 1 segundo (Figura R40C; $5,13 \pm 0,95$ % más ancho, $N = 5$ células, $P < 0,05$), en comparación con la duración del PA registrado tras fijar la membrana a -80 mV. Sin embargo, tras añadir níquel a la solución extracelular, los PAs fueron estadísticamente más anchos tras despolarizar la membrana, sin importar el tiempo de despolarización (Figura R40C).

Figura R40. La aplicación de níquel a la solución extracelular bloquea la plasticidad intrínseca a corto plazo.

- A)** Registros representativos de los PAs generados en respuesta a un pulso de corriente despolarizante, de 5 ms de duración a de intensidad umbral, tras fijar la membrana durante 5 minutos a -80 mV (negro) o a -60 mV (rojo), en solución extracelular control (**Aa**), o tras añadir el bloqueante de los canales tipo T de calcio, níquel ($500 \mu\text{M}$) (**Ab**), en neuronas del grupo P16-19.
- B)** Gráficos de barras mostrando el promedio de la velocidad de repolarización (izquierda) y duración media (derecha) de los PAs registrados con la solución extracelular control (**Ba**), y tras añadir níquel $500 \mu\text{M}$ (**Ab**). Se puede apreciar cómo la aplicación de níquel bloquea la plasticidad intrínseca a corto plazo. Así, tras despolarizar sostenidamente la membrana a -60 mV (rojo), la duración media del PA aumenta y la velocidad de repolarización disminuye con respecto del PA generado a -80 mV (negro). $N=18$ células.
- C)** Gráfico que muestra los valores promedio de la duración de los PAs registrados con respecto de la duración de la despolarización. Se puede apreciar cómo con el líquido extracelular control (negro), sólo es estadísticamente más ancho el PA generado con 1s de despolarización, con respecto al registrado a -80 mV. Sin embargo, tras la aplicación de níquel ($500 \mu\text{M}$) a la solución extracelular, se ensanchan todos los PAs registrados cuando la membrana se encuentra despolarizada, sin importar el tiempo de despolarización. $N=5$ células.

-80 mV vs -60 mV, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Similares resultados se encontraron cuando en lugar de níquel se añadió al líquido extracelular un bloqueante de los canales T más específico como el mibefradil ($10 \mu\text{M}$) (Figura R41; la velocidad de repolarización fue un $13,95 \pm 7,87$ % más lenta, $P < 0,05$, y la duración media un $11,51 \pm 5,48$ % mayor, $P < 0,05$, en los PAs generados a -60 mV con respecto de los generados a -80 mV; $N=6$ células).

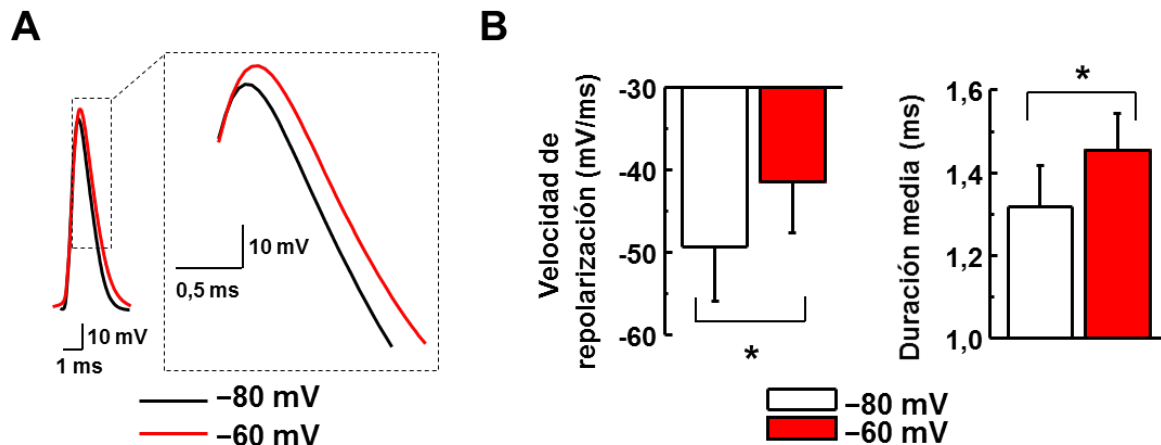


Figura R41. La aplicación de mibefradil a la solución extracelular bloquea los efectos de la plasticidad de la excitabilidad intrínseca a corto plazo sobre la morfología de los PAs

- A)** Registros representativos de los PAs generados en respuesta a un pulso de corriente despolarizante, de 5 ms de duración a intensidad umbral, tras fijar la membrana durante 5 minutos a -80 mV (negro) o a -60 mV (rojo) tras añadir el bloqueante de los canales tipo T de calcio, mibefradil (10 μ M), a la solución extracelular en neuronas del grupo P16-19.
- B)** Gráfico de barras del promedio de la velocidad de repolarización (izquierda) y duración media (derecha) de los PAs registrados en presencia de mibefradil (10 μ M). Se puede apreciar cómo la aplicación de mibefradil bloquea los efectos de la plasticidad sobre la morfología de los PAs, puesto que éstos tienen mayor duración media y menor velocidad de repolarización cuando se generan tras despolarizar la membrana durante 5 minutos a -60 mV (rojo), con respecto de los generados a -80 mV (negro). N=6 células.

-80 mV vs -60 mV, * P < 0,05.

Una vez demostrado que tanto la aplicación de níquel (500 μ M) como la de mibefradil (10 μ M) bloqueaban los efectos de la plasticidad sobre la morfología del PA, se estudió el posible bloqueo de los efectos de la plasticidad sobre la excitabilidad neuronal. Para ello se evaluó, tras fijar el potencial de la membrana a -80 mV o a -60 mV durante 5 minutos, la respuesta a trenes de 10 pulsos cuadrados de corriente despolarizante, con una frecuencia de 10 Hz, de 5 ms de duración a intensidad 1,1 veces superior a la intensidad umbral (diagrama del protocolo en Figura R28), en presencia de níquel (500 μ M) en la solución extracelular. Tras añadir níquel, el número de éxitos fue significativamente mayor al despolarizar sostenidamente la membrana (Figura R42; -80 mV: $2,91 \pm 0,62$ éxitos; -60 mV: $6,00 \pm 0,54$ éxitos; N=11, P<0,01).

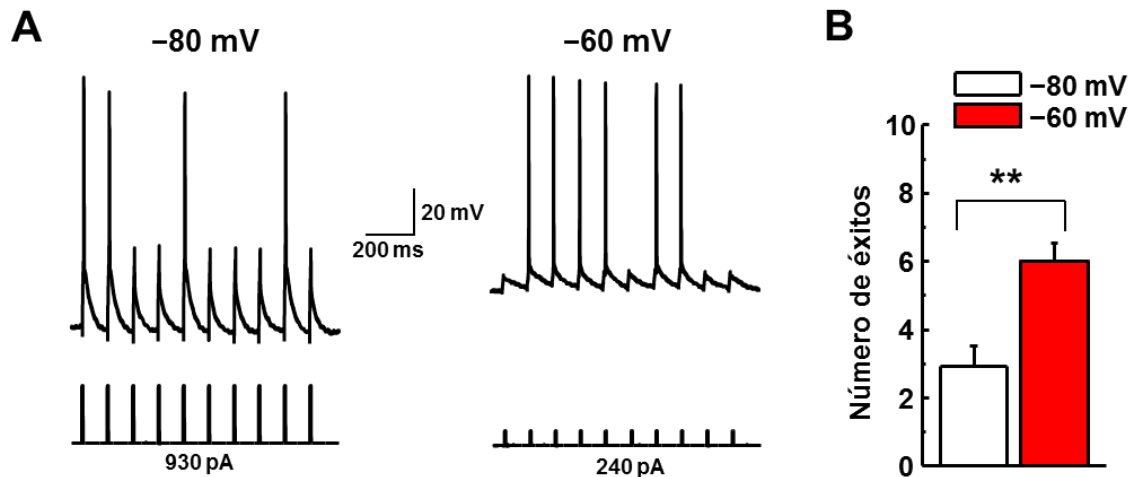


Figura R42. La aplicación de níquel a la solución extracelular bloquea los efectos de la plasticidad a corto plazo sobre la excitabilidad neuronal en respuesta a pulsos cortos de corriente.

- A)** Registros representativos de los PAs generados en respuesta a 10 pulsos de 5 ms de duración, 10 Hz de frecuencia, e intensidad 1,1 veces superior a la corriente umbral, tras fijar la membrana de durante 5 minutos a -80 mV (izquierda) o -60 mV (derecha), en presencia de níquel ($500 \mu\text{M}$) en el líquido extracelular, en neuronas del grupo P16-19.
- B)** Gráfico de barras del promedio de éxitos obtenidos con el protocolo descrito en **A)**, tras fijar la membrana a -80 mV (blanco) o a -60 mV (rojo), con níquel ($500 \mu\text{M}$) en el líquido extracelular. Se puede observar que tras la aplicación de níquel, el número de éxitos es mayor al despolarizar sostenidamente la membrana, en comparación con el producido tras fijar la membrana a -80 mV. $N = 11$ células.

-80 mV vs -60 mV, ** $P < 0,01$.

La aplicación extracelular de níquel ($500 \mu\text{M}$) y de mibefradil ($10 \mu\text{M}$) bloquearon los efectos de la plasticidad intrínseca a corto plazo descritas sobre la morfología del PA y sobre la excitabilidad neuronal. Por tanto, estos resultados sugieren que el calcio requerido para la inducción de la plasticidad procede de los canales implicados en la corriente tipo T de calcio.

2.7. Mecanismos de expresión de la plasticidad intrínseca a corto plazo.

2.7.1. El calcio procedente de la corriente T modula la corriente de potasio tipo A.

Diversos estudios han descrito una modulación de la corriente tipo A por calcio, tanto por modificación de las propiedades cinéticas de los canales (Rüschenschmidt et al. 2004; Anderson et al. 2010 a; Norris et al. 2011) como por cambio en la expresión de canales (Kim et al. 2007). Además, Molineux y colaboradores (2005) mostraron una interacción de las corrientes tipo A de potasio y tipo T de calcio en células estrelladas de cerebelo, cuyo papel establecía una relación entre el potencial de la membrana y la latencia para el disparo del primer PA (Molineux et al. 2005).

Dado que la plasticidad a corto plazo inducida al despolarizar sostenidamente la membrana es dependiente del influjo de calcio a través de los canales tipo T, y en ella está implicado un incremento de la corriente de potasio tipo A, se evaluó la posible modulación que la corriente T de calcio podría ejercer sobre la corriente tipo A. Para ello, se realizaron experimentos de *patch-clamp* en modo de fijación de voltaje en neuronas piramidales de CA1 disociadas, procedentes de ratas del grupo P16-19. En ellos se registró, a potencial de la membrana de -80 mV o en -60 mV, la corriente tipo A aislada según el protocolo descrito en la sección 2.5.2, en presencia de níquel ($500 \mu\text{M}$) en la solución extracelular.

La aplicación de níquel disminuye la corriente al pico y la constante de tiempo de inactivación de la corriente tipo A para potenciales de fijación de -80 mV y -60 mV (Tabla R11, Figura R43; Corriente: $P < 0,001$ para el factor níquel, Tau: $P < 0,05$ para el factor níquel), resultados similares a los descritos en la bibliografía (Rüschenschmidt et al. 2004).

Además, en presencia de níquel desaparecen las diferencias encontradas entre ambos potenciales de fijación en la intensidad de corriente al pico y en la constante de tiempo de inactivación (Tabla R11, Figura R43; Corriente: $P = 0,221$; Tau: $P = 0,153$).

Tabla R11: La adición de níquel a la solución extracelular bloquea los cambios por el potencial de fijación sobre la corriente A.

Edad Grupo	Control		Níquel 500 μ M		Número de células
	-80 mV	-60 mV	-80 mV	-60 mV	
I_A al pico (nA)	$4,22 \pm 0,23$	$5,12 \pm 0,30$ ***	$3,51 \pm 0,14$ ##	$3,64 \pm 0,14$ \$\$\$	11
τ inactivación (ms)	$53,0 \pm 5,3$	$63,9 \pm 7,3$ ***	$42,1 \pm 5,6$ ##	$44,6 \pm 5,7$ \$\$\$	11

-80 mV vs -60 mV, *** $P < 0,001$.

-80 mV, control vs níquel (500 μ M), ## $P < 0,01$.

-60 mV, control vs níquel (500 μ M), \$\$\$ $P < 0,001$.

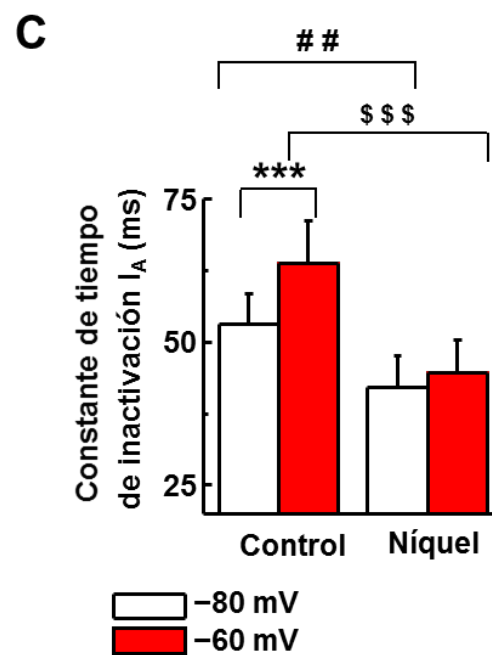
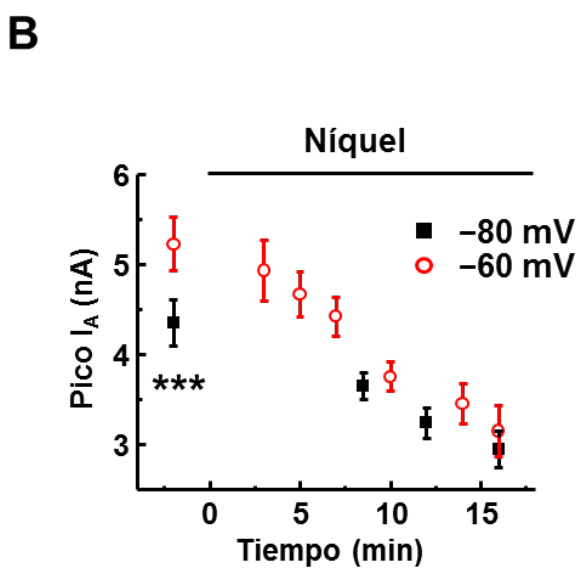
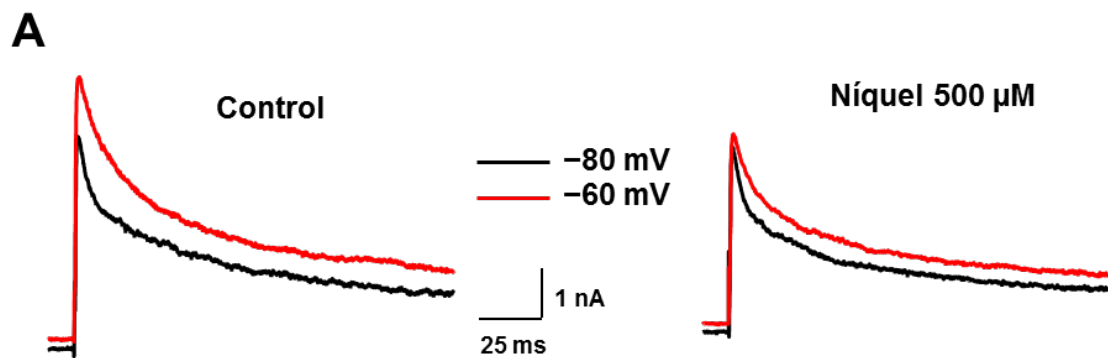


Figura R43. La aplicación de níquel a la solución extracelular bloquea el incremento de la corriente tipo A de potasio.

- A)** Registros representativos de la corriente tipo A aislada según el protocolo descrito en la sección 1.5.2 generados tras fijar la membrana a -80 mV (negro) o a -60 mV (rojo) durante 5 minutos, con la solución extracelular control (izquierda), y tras añadir el bloqueante de la corriente T de calcio, níquel ($500 \mu\text{M}$) en el líquido extracelular.
- B)** Perfil temporal que muestra cómo disminuye la amplitud de la corriente tipo A tras añadir níquel ($500 \mu\text{M}$), para ambos potenciales de fijación (-80 mV: $t_{10}=4.093$ $P<0.01$; -60 mV: $t_{10}=7.710$, $P<0.001$). Además se aprecia que en situación control, la amplitud de la corriente aislada es mayor a potencial de la membrana de -60 mV (círculos rojos), con respecto de a -80 mV (cuadrados negros). Sin embargo, tras la aplicación del níquel desaparecen las diferencias. $N=11$ células.
- C)** Gráfico de barras que muestra cómo la constante de tiempo de inactivación de la corriente tipo A promedio disminuye tras la aplicación de níquel ($500 \mu\text{M}$) a ambos potenciales de fijación, en comparación con la constante de tiempo de la corriente control. Además, se puede observar cómo en situación control, la constante de tiempo de inactivación es mayor cuando se fija el potencial de la membrana a -60 mV (rojo), con respecto de a -80 mV (blanco). Sin embargo, tras la aplicación del níquel, las constantes de tiempo de inactivación son similares. $N=11$ células.

-80 mV vs -60 mV, *** $P < 0,001$.

-80 mV, control vs níquel ($500 \mu\text{M}$), ## $P < 0,01$.

-60 mV, control vs níquel ($500 \mu\text{M}$), \$\$\$ $P < 0,001$.

Los resultados obtenidos mediante la aplicación de níquel reflejan que:

- El calcio procedente de la corriente tipo T modula la corriente tipo A, incrementando su intensidad de corriente y aumentando su constante de tiempo de inactivación.
- La modulación de la corriente A por parte de la corriente T es mayor cuando se despolarizó sostenidamente el potencial de la membrana a -60 mV, con respecto a la observada tras fijar la membrana a -80 mV.

2.7.2. La modulación de la corriente tipo A por la corriente tipo T es más probable que ocurra con el avance del desarrollo.

La corriente tipo A de potasio se asocia con la familia de los canales Kv4. Estudios de RT-PCR (Martina et al. 1998) y *Western blot* (Sánchez-Alonso et al. 2012) demostraron que durante el período de desarrollo empleado en esta tesis, las neuronas piramidales de CA1 expresan las subunidades Kv4.2 y Kv4.3. Por otra parte, la familia de canales responsables de la corriente tipo T de calcio son los Cav3, y se ha demostrado que las neuronas piramidales del hipocampo contienen altos niveles de ARNm del canal Cav3.2 (Talley et al. 1999).

Estudios del laboratorio de Turner han demostrado una interacción de las corrientes A de potasio y T de calcio, con la formación de nanodominios en los que se coexpresan los canales Kv4 de potasio y Cav3 de calcio (Molineux et al. 2005; Anderson et al. 2010 a; Anderson et al. 2010 b; Anderson et al. 2013; Heath et al. 2014). Dada la modulación que la corriente tipo T ejerce sobre la corriente tipo A en la plasticidad estudiada y la proximidad entre la fuente y el sensor de calcio, se estudió, mediante la técnica de *Western blot*, la expresión de los canales Cav3.2 y los Kv4.2 a lo largo del desarrollo postnatal para entender mejor cómo se desarrollaba la plasticidad. Para ello se emplearon extractos de hipocampo procedentes de ratas de 10, 17 y 31 días de edad postnatal.

La expresión de los canales Cav3.2 no experimentó cambios significativos de P10 a P31 (Figura R44, $P=0,215$). Sin embargo, la expresión de Kv4.2 disminuyó un $29,8 \pm 5,4$ % en el grupo P17 (Figura R44, $P<0,01$), y un $51,9 \pm 12,2$ % en el grupo P31, con respecto a P10 (Figura R44, $P<0,001$). Como consecuencia, la relación Cav3.2/Kv4.2 aumentó con la edad un $35,9 \pm 10,2$ % en el grupo P17 (Figura R44, $P<0,05$) y un $155,2 \pm 52,5$ % en el grupo P31, con respecto al grupo P10 (Figura R44, $P<0,001$). Este resultado indica que la fracción de corriente tipo A modulada por corriente tipo T puede aumentar con la edad si los canales están suficientemente próximos en la membrana celular. Por tanto, el incremento de la relación Cav3.2/Kv4.2 podría ser un indicador de la maduración de esta plasticidad con el desarrollo.

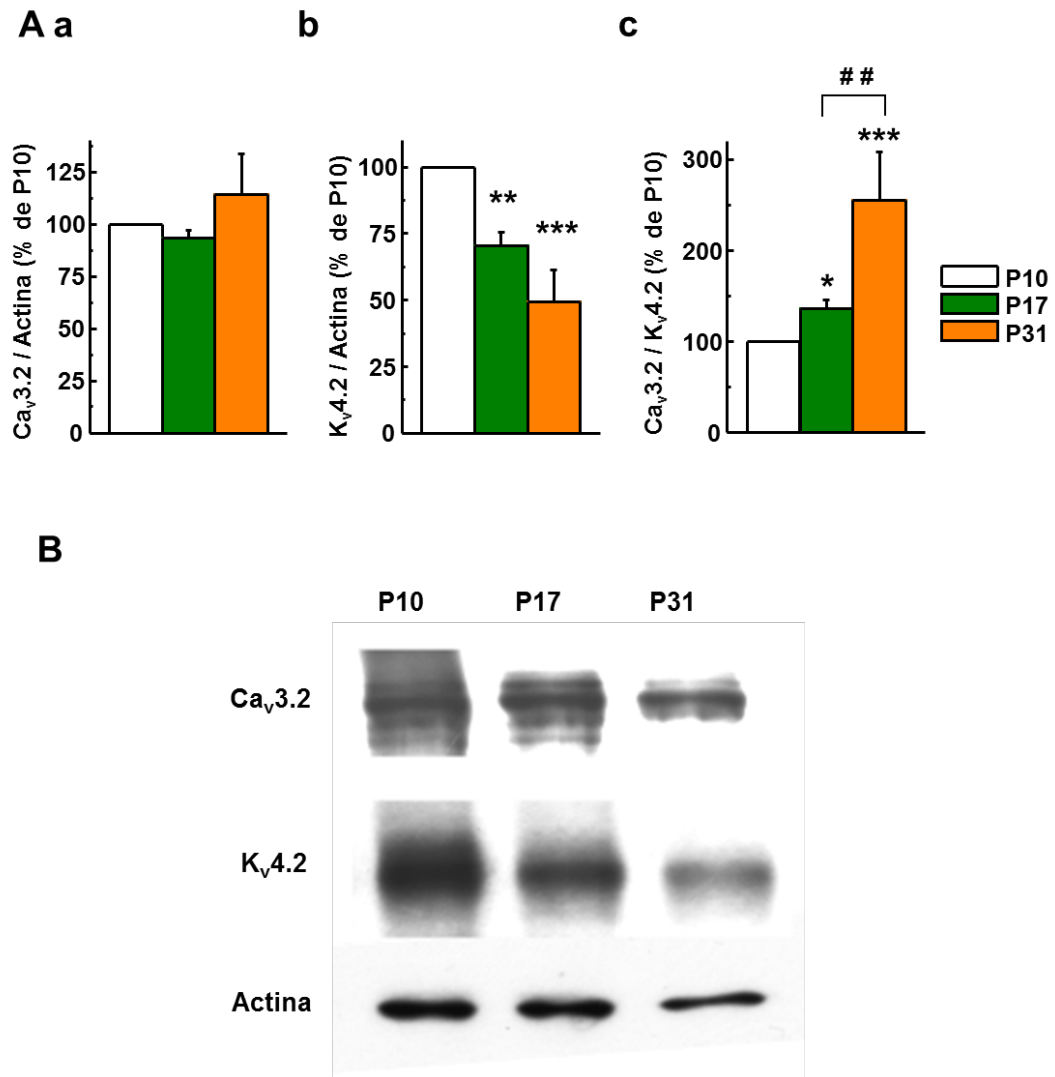


Figura R44. La fracción Cav3.2/Kv4.2 aumenta con la edad de desarrollo debido a una reducción en la expresión del canal Kv4.2.

- A)** Gráficos que muestran la expresión de Cav3.2 (a) y Kv4.2 (b), y la fracción Cav3.2/Kv4.2 (c) determinadas mediante *Western blot* en extractos de hipocampo de ratas de edad P10, P17, P31. Se empleó actina como control de carga y en cada experimento se calculó el porcentaje de cambio con respecto a P10. Se representa la media del análisis densitométrico de 6 experimentos independientes. La expresión de Kv4.2 disminuyó y la fracción Cav3.2/Kv4.2 aumentó tanto en P17 como en P31 en todos los experimentos.
- B)** Ejemplo representativo del análisis de *Western blot* de los canales Cav3.2 y Kv4.2 en extractos de la membrana de neuronas del hipocampo.

Comparación vs P10, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

P17 vs P31, ## $P < 0,01$.

2.7.3. La proteína de interacción con los canales de potasio 3 (*potassium channel-interacting protein 3, KChIP3*) es el sensor de calcio.

Una vez demostrada la modulación que ejerce el calcio procedente de la corriente T sobre la corriente tipo A de potasio, sólo falta encontrar el sensor de calcio. Se han descrito tres tipos de proteínas de interacción con los canales de potasio dependientes de voltaje Kv4 (*Kv4 channel-interacting proteins, KChIPs*), las cuales modulan la densidad de corriente y las cinéticas de inactivación y recuperación de la inactivación de la subunidad α de los canales Kv4, y presentan dominios de unión al calcio (An et al. 2000). Además, varios trabajos demostraron la existencia de nanodominios en los que se coexpresan los canales Kv4 implicados en la corriente tipo A, y los canales Cav3 implicados en la corriente tipo T, y que la KChIP3 actúa como sensor de calcio para modular la inactivación dependiente de voltaje de los canales Kv4 en respuesta a la entrada de calcio a través de los canales Cav3 (Anderson et al. 2010 a; Anderson et al. 2010 b; Anderson et al. 2013; Heath et al. 2014).

Considerando que tanto la corriente tipo A como la corriente T se activan e inactivan a potenciales subumbrales, que ambas están implicadas en la plasticidad intrínseca descrita, y que los canales Cav3 tienen que estar próximos al sensor de calcio, ya que la plasticidad se bloquea con BAPTA, pero no con EGTA, el último aspecto analizado en relación a la plasticidad intrínseca fue la evaluación del posible papel de la KChIP3 como sensor de calcio en la expresión de la plasticidad. Para ello se realizaron registros de *patch-clamp* en fijación de corriente, en los que se añadió un anticuerpo anti-KChIP3 a la solución intracelular (en concentración 1:100), el cual se esperaba que bloqueara la KChIP3, y por tanto, su posible capacidad para actuar como sensor de calcio en la modulación de los canales Kv4.2.

En una primera tanda de experimentos se analizó la morfología de los PAs generados por neuronas del grupo P16-19 mediante la inyección de pulsos cuadrados despolarizantes, de 5 ms de duración y de intensidad de corriente umbral, tras fijar la membrana durante 5 minutos a -80 mV o a -60 mV, y en presencia del anticuerpo anti-KChIP3 en la solución intracelular. Los PAs presentan mayor duración media y menor velocidad de repolarización cuando se generan tras despolarizar sostenidamente la membrana a -60 mV, en comparación con los generados a potenciales de fijación de -80 mV (Figura R45; la velocidad de repolarización fue un $7,56 \pm 3,24$ % más lenta, $P < 0,05$, y la duración media un $4,82 \pm 2,31$ % mayor, $P = 0,061$, en los PAs generados a -60 mV con respecto de los generados a -80 mV; $N=12$ células).

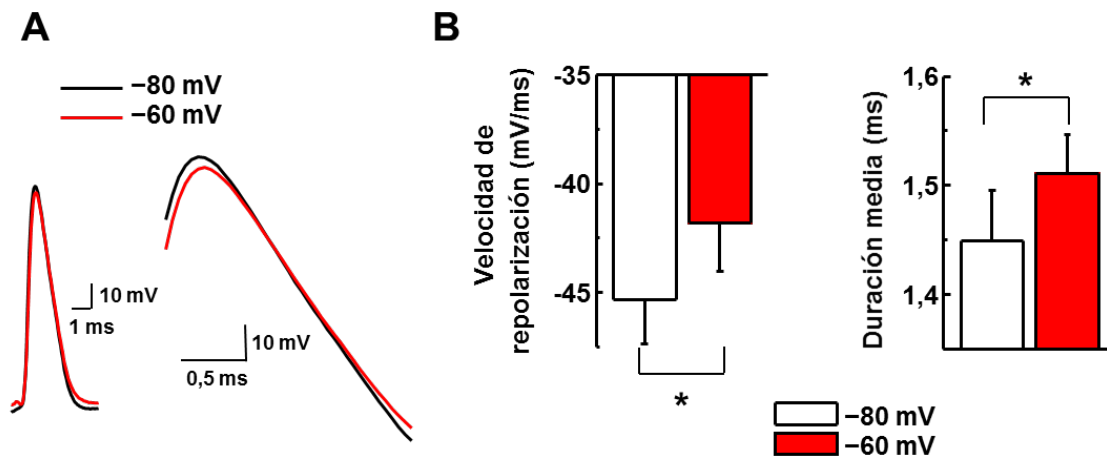


Figura R45. La aplicación de anti-KChIP3 a la solución intracelular bloquea los efectos de la plasticidad de la excitabilidad intrínseca a corto plazo sobre la morfología de los PAs

- A)** Registros representativos de los PAs generados en neuronas del grupo de edad P16-19 en respuesta a un pulso de corriente de 5 ms de duración a intensidad umbral, tras fijar el potencial de la membrana durante 5 minutos a -80 mV (negro) o -60 mV (rojo) tras añadir anticuerpos anti-KChIP3 (1:100) en la solución intracelular.
- B)** Gráficos de barras comparando el promedio de la velocidad de repolarización (izquierda) y la duración media (derecha) de los PAs registrados en presencia de anticuerpos anti-KChIP3 (1:100) en la solución intracelular. Se puede apreciar cómo la aplicación de anti-KChIP3 bloquea los efectos de la plasticidad sobre la morfología de los PAs, puesto que éstos tienen mayor duración media y menor velocidad de repolarización cuando se generan tras despolarizar la membrana durante 5 minutos a -60 mV (rojo), con respecto de los generados a -80 mV (negro). N=12 células.

-80 mV vs -60 mV, * $P < 0,05$.

Por último, se estudió el posible bloqueo de los efectos que la plasticidad intrínseca a corto plazo descrita producía sobre la excitabilidad neuronal al añadir anti-KChIP3 en la solución intracelular. Para ello se evaluó, tras fijar el potencial de la membrana a -80 mV y a -60 mV durante 5 minutos, la respuesta a trenes de 10 pulsos cuadrados de corriente despolarizante, con una frecuencia de 10 Hz, de 5 ms de duración a intensidad 1,1 veces superior a la intensidad de corriente umbral (diagrama del protocolo en la Figura R28). En presencia del anticuerpo anti-KChIP3, el número de éxitos fue mayor al despolarizar sostenidamente la membrana (Figura R46; -80 mV: $2,86 \pm 0,18$ éxitos; -60 mV: $6,14 \pm 1,1$ éxitos; N=4 células; $P=0,068$, Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon).

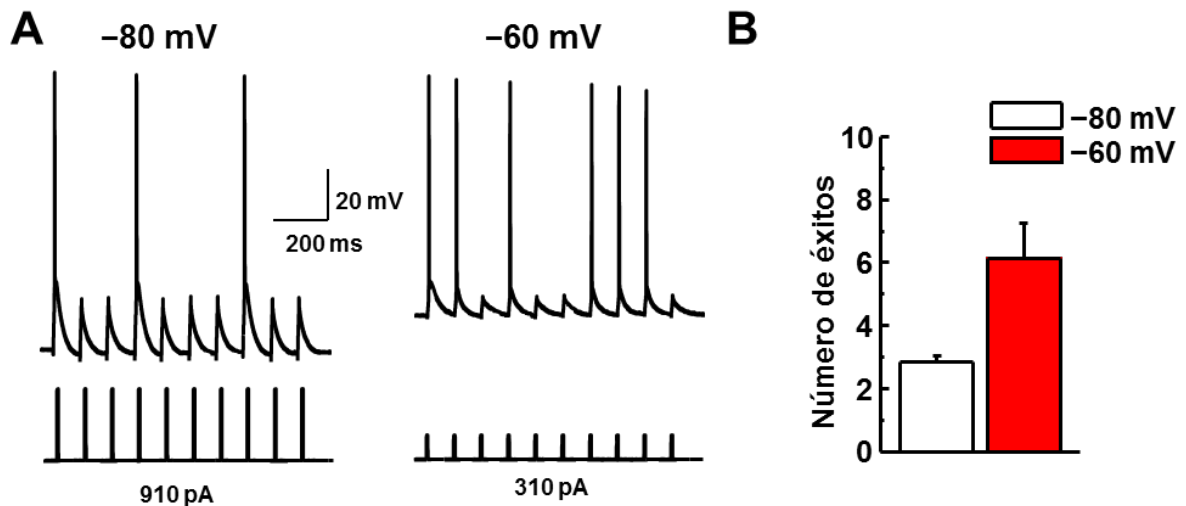


Figura R46. La aplicación de anti-KChIP3 en la solución intracelular bloquea los efectos de la plasticidad a corto plazo sobre la excitabilidad neuronal en respuesta a pulsos cortos de corriente.

- A)** Registros representativos de los PAs generados en respuesta a 10 pulsos de 5 ms de duración, 10 Hz de frecuencia, a intensidad 1,1 veces superior a la corriente umbral, tras fijar la membrana durante 5 min a -80 mV (izquierda) o -60 mV (derecha), en neuronas del grupo P16-19 rellenas con una solución intracelular a la que se añadió anticuerpos anti-KChIP3 (1:100).
- B)** Gráfico de barras del promedio de éxitos obtenidos siguiendo el protocolo descrito en **A)**, tras fijar la membrana a -80 mV (blanco) o -60 mV (rojo). Se puede observar cómo al añadir anticuerpos anti-KChIP3 (1:100), el número de éxitos es mayor cuando se fija la membrana a -60 mV con respecto a -80 mV (N=4 células, P=0,068, prueba de los rangos con signo de Wilcoxon).

La aplicación de anticuerpos anti-KChIP3 en la solución intracelular bloqueó la expresión de la plasticidad a corto plazo inducida por despolarización. Por tanto, se demuestra que la plasticidad se produce en los nanodominios descritos por el laboratorio de Turner (Anderson et al. 2010 a; Anderson et al. 2010 b; Anderson et al. 2013; Heath et al. 2014), en los que el calcio que entra a través de los canales tipo T al despolarizar sostenidamente la membrana, actúa sobre los dominios de unión a calcio que posee la KChIP3, provocando una modulación de la subunidad α del canal Kv4 (la cual es la responsable de la formación del poro) por parte de la KChIP3, aumentando la conductancia del canal, y como consecuencia disminuyendo la excitabilidad neuronal.

3. Efectos del calcio extracelular sobre la excitabilidad intrínseca de las neuronas piramidales de CA1.

3.1. La concentración extracelular de calcio no afecta a las propiedades pasivas de la membrana.

El calcio es un ion fundamental en la regulación neuronal. Su ingreso al citoplasma a través de canales específicos modula: la excitabilidad intrínseca de la neurona codificando el patrón de disparo de los PAs (de disparo regular o en ráfagas) (Chen et al. 2005; Metz et al. 2005; Sánchez-Alonso et al. 2010), la morfología del PA durante disparos de alta frecuencia debido a la implicación de los canales de potasio dependientes de calcio en la fase de repolarización del PA (Ma & Koester 1996; Shao et al. 1999; Sah & Faber 2002) o la hiperpolarización dependiente de calcio que se genera tras el desarrollo de varios PAs en un período corto de tiempo (Lancaster & Nicoll 1987; Storm 1987; Sah & Faber 2002; Stocker 2004; Adelman et al. 2012; Chen et al. 2014). Además, el calcio está implicado en la inducción de casi todas las formas de plasticidad sinápticas o intrínsecas (Lynch et al. 1983; Dudek & Bear 1992; Zucker & Regehr 2002; Fan et al. 2005; Grubb & Burrone 2010; O'Leary et al. 2010), incluida la plasticidad de la excitabilidad intrínseca inducida por despolarización descrita en el segundo bloque de los Resultados.

En este tercer bloque se estudió el papel del calcio extracelular sobre la excitabilidad intrínseca de las neuronas piramidales de CA1. El primer aspecto analizado fue el posible efecto de la concentración extracelular de calcio sobre las propiedades electrofisiológicas básicas de la membrana. Para ello se realizaron registros de *patch-clamp* en modo de fijación de corriente en neuronas piramidales de CA1 procedentes de ratas del grupo de edad P16-19. En ellos se perfundieron las rodajas de hipocampo con diferentes soluciones extracelulares, cuya composición variaba únicamente en su concentración de calcio: 3 mM, 1 mM y 0,5 mM. Tras la administración de cada una de las soluciones, se registró el potencial de la membrana en reposo, y posteriormente, a un potencial de fijación de -80 mV, se inyectaron pulsos cuadrados de corriente hiperpolarizante con una intensidad de -20 pA y una duración de 300 ms. De la respuesta a este pulso de corriente se calcularon los valores de resistencia, capacidad y constante de tiempo de la membrana.

Tras comparar los tres grupos no se observó un efecto de la concentración extracelular de calcio sobre el potencial de la membrana en reposo (Tabla R12, $P=0,388$). Además, tampoco se observó ningún cambio en el resto de las propiedades pasivas estudiadas al variar la concentración extracelular de calcio (Tabla R12, Resistencia de la membrana: $P=0,127$; Capacidad de la membrana: $P=0,157$; Constante de tiempo de la membrana: $P=0,217$).

Tabla R12. La concentración extracelular de calcio no afecta a las propiedades electrofisiológicas básicas.

Concentración extracelular de calcio	3 mM	1 mM	0.5 mM
V_m reposo (mV)	-69,7 ± 1,7	-70,5 ± 1,4	-69,1 ± 1,4
Resistencia de la membrana (MΩ)	118,4 ± 7,3	112,4 ± 8,1	111,7 ± 7,5
Capacidad de la membrana (pF)	143,2 ± 7,8	144,9 ± 10,0	152,1 ± 7,4
Constante de tiempo (ms)	16,5 ± 0,8	15,7 ± 1,1	16,7 ± 1,1
Número de células	12	12	12

Los valores de potencial de la membrana en reposo se obtuvieron antes de fijar la membrana a -80 mV.

3.2. Efecto de la concentración extracelular de calcio sobre la morfología del potencial de acción.

La concentración extracelular de calcio afecta a la morfología del PA debido a la implicación de los canales de potasio dependientes de calcio en la fase de repolarización del PA (Lancaster & Nicoll 1987; Storm 1987; Warman et al. 1994; Poolos & Johnston 1999; Faber & Sah 2003; Sun et al. 2009). Además, la concentración extracelular de iones divalentes modula las curvas de activación de diversos canales dependientes de voltaje, como los canales implicados en la corriente transitoria de sodio, la corriente de potasio tipo A, otras corrientes rectificadoras retardadas de potasio o la corriente catiónica tipo H (Hahin & Campbell 1983; Mayer & Sugiyama 1988; Hille 2001).

Por tanto, un cambio en la concentración extracelular de calcio podría modificar la morfología del PA. Para comprobar esta hipótesis, se realizaron registros de *patch-clamp* en fijación de corriente en neuronas piramidales de CA1 procedentes de ratas del grupo de edad P16-19 con el potencial de la membrana a -80 mV. En una primera serie de experimentos (N=12 células), se emplearon tres soluciones extracelulares diferentes, que variaban únicamente en su concentración de calcio (3, 1 y 0,5 mM). Con cada una de las tres soluciones extracelulares, se generó un PA mediante un pulso cuadrado de 5 ms de duración y con una intensidad de corriente umbral.

Tras analizar los PAs generados con las tres soluciones, se observó que al disminuir la concentración extracelular de calcio se produce: una hiperpolarización del umbral ($P<0,001$), un aumento de la amplitud ($P<0,01$), un aumento de la velocidad de despolarización ($P<0,01$) y una disminución de la velocidad en la segunda mitad de la fase repolarizante (medida desde el potencial de la membrana correspondiente con la amplitud media del PA hasta el correspondiente con el 20 % de la amplitud) ($P<0,001$), mientras que la velocidad de repolarización en el primer tercio ($P=0,384$) y la duración media del PA ($P=0,142$) no se vieron afectadas (Figura R47, Tabla R13) en comparación con el PA registrado a una concentración de calcio de 3 mM. Por otra parte, al disminuir la concentración extracelular de calcio se observó una disminución de la corriente umbral necesaria para el disparo del PA junto con la hiperpolarización del umbral de disparo (Ca^{2+} 3 mM: 673 ± 43 pA; Ca^{2+} 1 mM: 494 ± 44 pA; Ca^{2+} 0,5 mM: 384 ± 41 pA; N=12 células, $P<0,001$).

Tabla R13. Efecto de la concentración extracelular de calcio sobre los parámetros del PA.

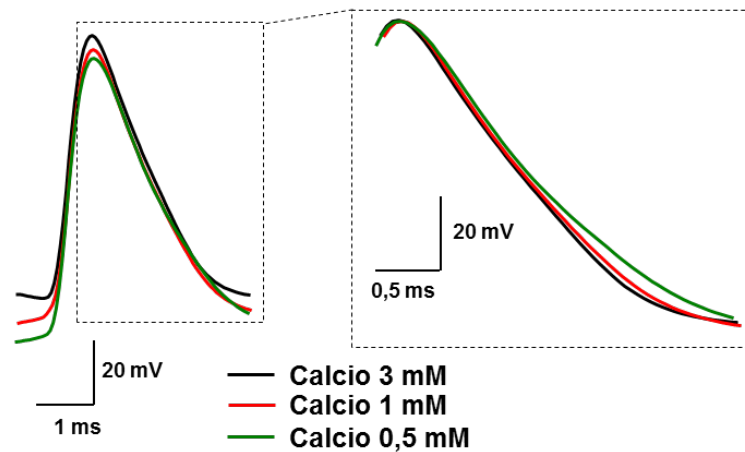
Concentración extracelular de calcio	3 mM	1 mM	0,5 mM
Amplitud (mV)	83,3 ± 2,4	86,5 ± 2,1 *	89,5 ± 1,7 ## / \$\$
Umbral de disparo (mV)	-58,3 ± 1,1	-66,1 ± 1,2 ***	-70,2 ± 1,4 ### / \$\$
Vel. despolarización (mV/ms)	182,3 ± 13,4	191,9 ± 15,5	199,7 ± 10,3 ##
Vel. repolarización 1er tercio (mV/ms)	-60,6 ± 2,7	-62,7 ± 2,6	-61,9 ± 2,5
Vel. Repolarización 2ª mitad (mV/ms)	-51,6 ± 2,4	-47,5 ± 2,7 *	-41,9 ± 2,5 ### / \$\$
Duración media (ms)	1,19 ± 0,03	1,20 ± 0,04	1,23 ± 0,04
Número de células	12	12	12

3 mM vs 1 mM, * P < 0,05, *** P < 0,001.

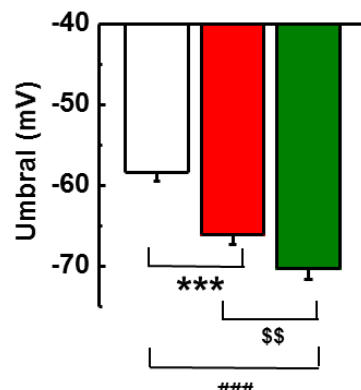
3 mM vs 0,5 mM, ## P < 0,01, ### P < 0,001.

1 mM vs 0,5 mM, \$\$ P < 0,01.

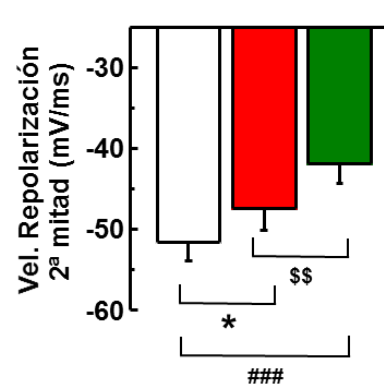
A



B a



b



Calcio 3 mM
 Calcio 1 mM
 Calcio 0,5 mM

Figura R47: Efectos de la concentración extracelular de calcio sobre la morfología del PA.

- A)** Registro representativo del PA generado mediante un pulso de 5 ms de duración a intensidad umbral tras emplear una solución extracelular cuya concentración de calcio es de 3 mM (negro), 1 mM (rojo) y 0,5 mM (verde), en neuronas del grupo P16-19. A la derecha se muestra ampliada la fase repolarizante, igualando la amplitud al pico de los tres PAs.
- B)** Gráficos de barras representando los valores promedio del umbral de disparo (**Ba**) y de la velocidad de la segunda mitad de la fase repolarizante (**Bb**) de los PAs registrados tras perfundir las rodajas con una solución extracelular cuya concentración de calcio fue: 3 mM (blanco), 1 mM (rojo) o 0,5 mM (verde). Se aprecia una hiperpolarización del umbral de disparo al disminuir la concentración extracelular de calcio. También se puede observar una disminución de la velocidad de la segunda mitad de la fase repolarizante al reducir el calcio extracelular. N=12 células.

Calcio 3 mM vs Calcio 1 mM: * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$.

Calcio 3 mM vs Calcio 0,5 mM: ### $P < 0,001$.

Calcio 1 mM vs Calcio 0,5 mM: \$\$ $P < 0,01$.

Los efectos observados al disminuir la concentración extracelular de calcio sobre la morfología del PA sugieren varias posibilidades:

- Una actuación del calcio sobre dianas específicas para dicho ion.
- Y/o Un efecto producido por el calcio en su condición de ion divalente, modificando las curvas de activación de distintos canales (Hille 2001).

Para conocer con más detalle el origen de los cambios observados en la morfología del PA al disminuir la concentración extracelular de calcio, se realizó una nueva serie de experimentos (N=6 células) en los que se modificaron las concentraciones extracelulares de calcio y de magnesio, de modo que se emplearon tres nuevas soluciones: una solución con una concentración 3 mM de calcio y 1,3 mM de magnesio (4,3 mM de divalentes), otra con una concentración 0,5 mM de calcio y 3,8 mM de magnesio (4,3 mM de divalentes), y una tercera con una concentración 0,5 mM de calcio y 1,3 mM de magnesio (1,8 mM de divalentes). De nuevo se generó un PA con cada una de las tres soluciones extracelulares mediante un pulso cuadrado de 5 ms de duración y con una intensidad de corriente umbral.

Con la solución de 0,5 mM de calcio y 1,3 mM de magnesio se obtuvo una hiperpolarización del umbral de disparo estadísticamente significativa en el umbral de disparo, en comparación con el umbral de disparo observado con las soluciones que mantuvieron constante la concentración extracelular de divalentes (Tabla R14, Figura R48, $P < 0,01$ frente al grupo con la solución control, y $P < 0,05$ frente al grupo cuya solución se componía de calcio 0,5

mM + magnesio 3,8 mM. No se observaron diferencias entre los grupos cuya concentración de divalentes fue de 4,3 mM, $P=1,000$). Por tanto, la hiperpolarización del umbral observada en la Figura R47 al disminuir la concentración extracelular de calcio fue en realidad debida a una disminución en la concentración extracelular de iones divalentes, que produciría un desplazamiento hacia la izquierda de la curva de activación de la corriente transitoria de sodio (Hille, 2001).

Por el contrario, la velocidad en la segunda mitad de la fase repolarizante del PA disminuyó al aplicar las soluciones de 0,5 mM de calcio, independientemente de la concentración total de iones divalentes (1,8 o 4,3 mM), en comparación con la velocidad de repolarización del PA observada al emplear la solución extracelular control (calcio 3 mM y de magnesio 1,3 mM) (Tabla R14, Figura R48, $P<0,001$ con respecto del grupo cuya solución estaba compuesta por 0,5 mM de calcio + 3,8 mM de magnesio; $P<0,05$ con respecto de la solución compuesta por 0,5 mM de calcio + 1,3 mM de magnesio). Este resultado sugiere la implicación específica del ion calcio en la segunda mitad de la fase repolarizante, posiblemente regulando la actividad de los canales de potasio dependientes de calcio (Lancaster & Nicoll 1987; Storm 1987; Poolos & Johnston 1999; Sun et al. 2009).

Tabla R14. Efecto de la concentración extracelular de iones divalentes sobre los parámetros del PA.

Concentración extracelular de iones divalentes (mM)	Ca ²⁺ 3 + Mg ²⁺ 1,3 (total 4,3)	Ca ²⁺ 0,5 + Mg ²⁺ 3,8 (total 4,3)	Ca ²⁺ 0,5 + Mg ²⁺ 1,3 (total 1,8)
Amplitud (mV)	84,8 ± 2,5	83,6 ± 2,5	86,3 ± 3,7
Umbral de disparo (mV)	-57,6 ± 1,4	-57,6 ± 2,0	-63,9 ± 1,4 ## / \$
Vel. despolarización (mV/ms)	207,7 ± 12,3	209,0 ± 10,6	214,3 ± 13,2
Vel. repolarización 1er tercio (mV/ms)	-50,6 ± 2,3	-51,2 ± 2,1	-51,3 ± 2,2
Vel. Repolarización 2ª mitad (mV/ms)	-49,5 ± 2,1	-41,7 ± 2,3***	-40,1 ± 4,0 #
Duración media (ms)	1,31 ± 0,05	1,31 ± 0,06	1,33 ± 0,06
Número de células	6	6	6

Ca²⁺ 3 + Mg²⁺ 1.3 vs Ca²⁺ 0,5 + Mg²⁺ 3,8, *** $P < 0,001$.

Ca²⁺ 3 + Mg²⁺ 1.3 vs Ca²⁺ 0,5 + Mg²⁺ 1,3, # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$.

Ca²⁺ 0.5 + Mg²⁺ 3.8 vs Ca²⁺ 0,5 + Mg²⁺ 1,3, \$ $P < 0,05$.

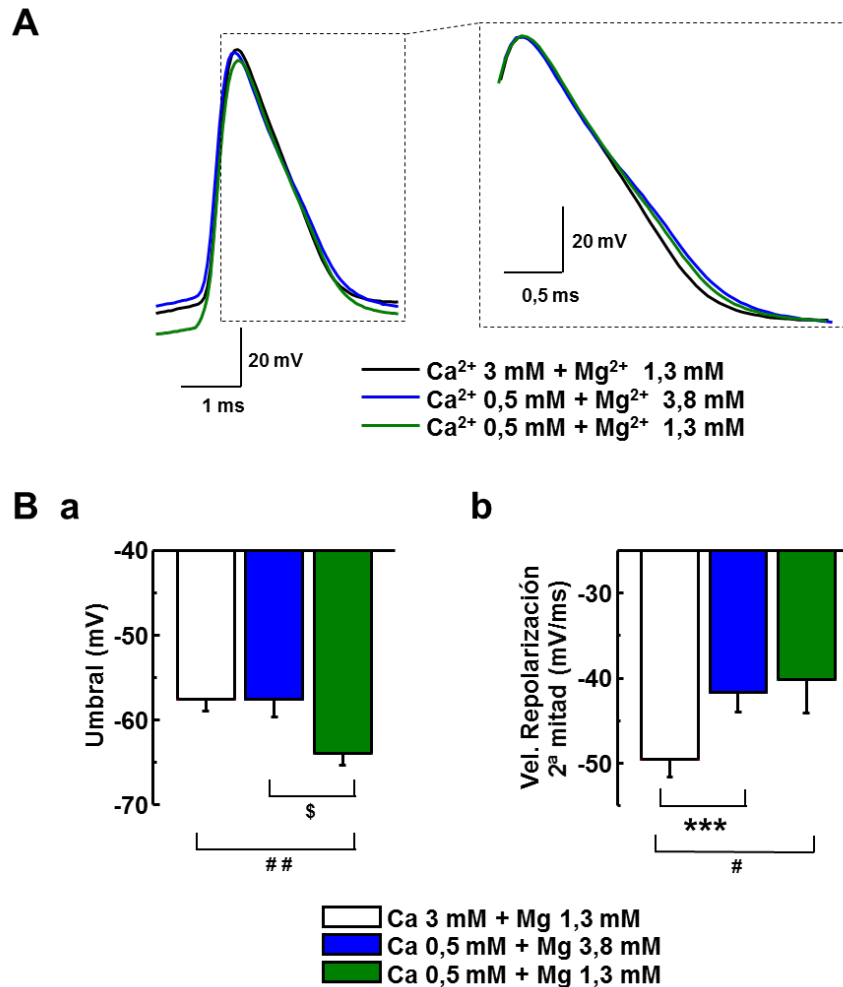


Figura R48: Efecto de la concentración extracelular de iones divalentes sobre la morfología del PA.

- A)** Registro representativo del PA generado mediante un pulso de 5 ms de duración a intensidad umbral tras perfundir la rodaja con una solución extracelular con las siguientes concentraciones de iones divalentes: calcio 3 mM + magnesio 1,3 mM (negro), calcio 0,5 mM + magnesio 3,8 mM (azul) y calcio 0,5 mM + magnesio 1,3 mM (verde), en neuronas del grupo P16-19. A la derecha de se muestra ampliada la fase repolarizante, igualando la amplitud al pico de los tres PAs.
- B)** Gráficos de barras representando los valores promedio del umbral de disparo (Ba) y de la velocidad de la segunda mitad de la fase repolarizante (Bb) de los PAs registrados tras perfundir las rodajas con una solución extracelular con las siguientes concentraciones de iones divalentes: calcio 3 mM + magnesio 1,3 mM (blanco), calcio 0,5 mM + magnesio 3,8 mM (azul) y calcio 0,5 mM + magnesio 1,3 mM (verde), en neuronas del grupo P16-19. Se aprecia que el umbral de disparo se hiperpolariza al disminuir la concentración extracelular total de iones divalentes, con respecto del umbral observado en los PAs registrados con soluciones extracelulares cuya concentración de divalentes fue de 4,3 mM, sin importar la concentración de calcio. Sin embargo, la velocidad de repolarización disminuye en los PAs generados en soluciones extracelulares cuya concentración de calcio fue de 0,5 mM, en comparación con los registrados con una solución extracelular cuya concentración de calcio fue 3 mM. N=6 células.

Ca^{2+} 3 mM + Mg^{2+} 1,3 mM vs Ca^{2+} 0,5 mM + Mg^{2+} 3,8 mM: *** $P < 0,001$.

Ca^{2+} 3 mM + Mg^{2+} 1,3 mM vs Ca^{2+} 0,5 mM + Mg^{2+} 1,5 mM: # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$.

Ca^{2+} 0,5 mM + Mg^{2+} 3,8 mM vs Ca^{2+} 0,5 mM + Mg^{2+} 1,5 mM: \$ $P < 0,05$.

3.3. Efecto de la concentración extracelular de calcio sobre la despolarización post-potencial.

Las neuronas piramidales de CA1 no recuperan inmediatamente su potencial de la membrana en reposo cuando disparan un PA. Algunas neuronas presentan tras la repolarización una despolarización post-potencial (ADP, *afterdepolarization potential*) (Kandel & Spencer 1961; Schwartzkroin 1975; R Azouz et al. 1996), cuya morfología está determinada por la actividad de la corriente persistente de sodio, las corrientes tipo R y tipo T de calcio y las corrientes tipo A y tipo M de potasio (Azouz et al. 1996; Magee & Carruth 1999; Chen et al. 2005; Metz et al. 2005; Sánchez-Alonso et al. 2010).

El papel de las corrientes R y T de calcio es fundamental para la generación de la ADP en las neuronas piramidales de CA1 durante el período de edad comprendido entre los 14 y 20 días (Chen et al. 2005; Metz et al. 2005; Sánchez-Alonso et al. 2010). Sin embargo, Su y colaboradores observaron un incremento de la amplitud de la ADP al disminuir la concentración extracelular de calcio en ratas adultas (Su et al. 2001). Con el objetivo de desentrañar esta controversia, se estudió el efecto de la concentración extracelular de calcio sobre la morfología de la ADP. Para ello se realizaron experimentos de *patch-clamp* en fijación de corriente, tras fijar el potencial de la membrana a -80 mV, se generó un PA con cada una de las soluciones extracelulares mediante un pulso cuadrado despolarizante de 5 ms de duración, a una intensidad de corriente umbral, en neuronas piramidales de CA1 del grupo P16-19. Con un primer grupo (N=12 células) se utilizaron tres soluciones extracelulares, en cuya composición sólo se modificó la concentración de calcio (3, 1 y 0,5 mM), y por tanto se varió la concentración extracelular de iones divalentes. En un segundo grupo de células (N=8 células) se emplearon dos soluciones en las que se variaron las concentraciones de calcio y de magnesio, manteniendo constante la concentración total de iones divalentes (4,3 mM): una solución control (calcio 3 mM y magnesio 1,3 mM), y una solución con bajo calcio (calcio 0,5 mM y magnesio 3,8 mM).

En los registros realizados tras modificar únicamente la concentración extracelular de calcio, se observó una reducción de la amplitud de la ADP (Figura R49A, Ca^{2+} 3 mM: $26,9 \pm 1,8$ mV; Ca^{2+} 1 mM: $18,9 \pm 1,0$ mV; Ca^{2+} 0,5 mM: $15,0 \pm 1,2$ mV; $P < 0,01$) y de su duración media (Figura R49A, Ca^{2+} 3 mM: $23,6 \pm 2,1$ ms; Ca^{2+} 1 mM: $18,6 \pm 1,0$ ms; Ca^{2+} 0,5 mM: $18,2 \pm 1,2$ ms; $P < 0,05$) al disminuir la concentración extracelular de calcio.

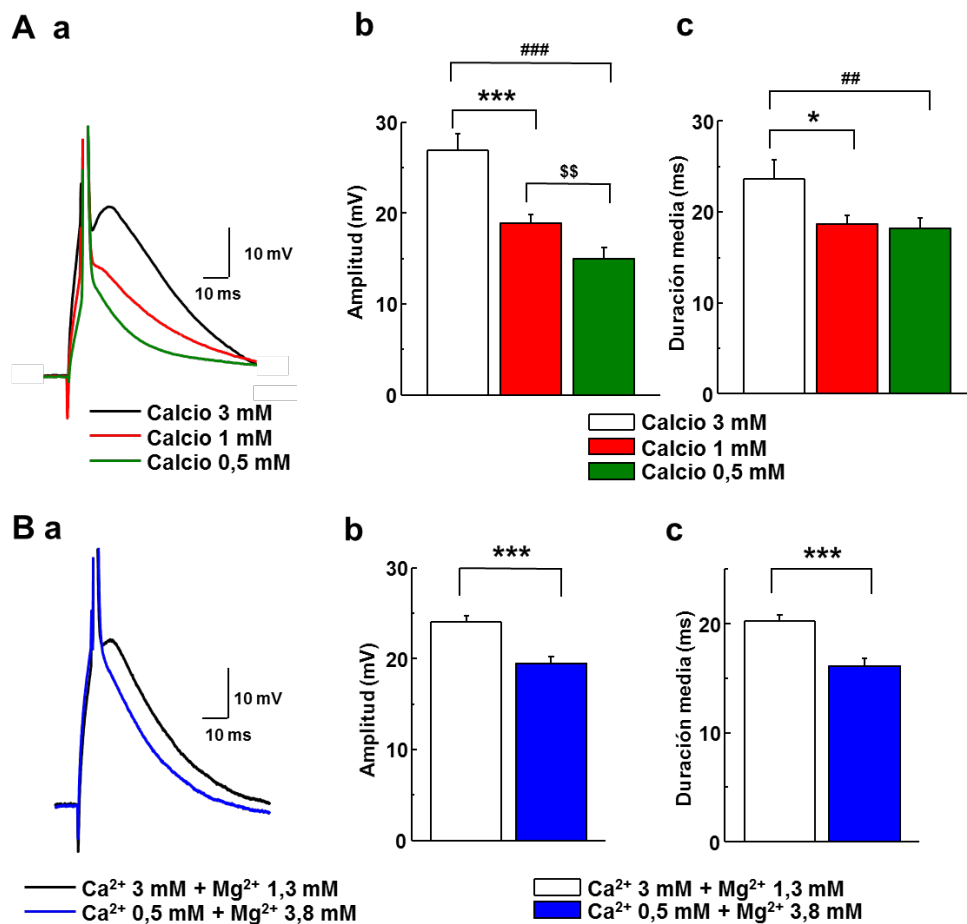


Figura R49: Efectos de la concentración extracelular de calcio sobre la morfología de la ADP.

- A)** Análisis de la morfología de la ADP tras modificar la concentración extracelular de calcio en neuronas piramidales de CA1 del grupo P16-19. Aa) Registro representativo de la ADP generado tras un PA obtenido mediante un pulso de 5 ms de duración a intensidad umbral tras perfundir la rodaja con una solución extracelular cuya concentración de calcio fue de 3 mM (negro), 1 mM (rojo) y 0,5 mM (verde). A la derecha se muestran dos gráficos de barras representando los valores promedio de la amplitud de la ADP (Ab) y su duración media (Ac) tras perfundir las rodajas con una solución extracelular cuya concentración de calcio fue: 3 mM (blanco), 1 mM (rojo) o 0,5 mM (verde). Se puede observar cómo al disminuir la concentración extracelular de calcio se reduce la amplitud y la duración media de la ADP. N=12 células.

Calcio 3 mM vs Calcio 1 mM: * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$.

Calcio 3 mM vs Calcio 0,5 mM: ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$.

Calcio 1 mM vs Calcio 0,5 mM: \$\$ $P < 0,01$.

- B)** Análisis de la morfología de la ADP tras modificar la concentración extracelular de calcio, equilibrando la concentración extracelular de iones divalentes en neuronas del grupo P16-19. Ba) Registro representativo de la ADP generado tras un PA obtenido mediante un pulso de 5 ms de duración e intensidad umbral tras perfundir la rodaja con las siguientes concentraciones de iones divalentes: calcio 3 mM + magnesio 1,3 mM (negro) y calcio 0,5 mM + magnesio 3,8 mM (azul). A la derecha se muestran dos gráficos de barras representando los valores promedio de la amplitud de la ADP (Ab) y su duración media (Ac) tras perfundir las rodajas con las siguientes concentraciones de iones divalentes: calcio 3 mM + magnesio 1,3 mM (negro) y calcio 0,5 mM + magnesio 3,8 mM (azul). De nuevo se puede observar cómo al disminuir la concentración extracelular de calcio se reduce la amplitud y la duración media de la ADP. N=8 células.

Ca^{2+} 3 mM + Mg^{2+} 1,3 mM vs Ca^{2+} 0,5 mM + Mg^{2+} 3,8 mM: *** $P < 0,001$.

En los registros realizados tras modificar las concentraciones extracelulares de calcio y de magnesio (manteniendo estable la concentración extracelular de iones divalentes), volvió a observarse una reducción de la amplitud de la ADP (Figura R49B, Ca^{2+} 3 mM + Mg^{2+} 1,3 mM: $24,1 \pm 0,6$ mV; Ca^{2+} 0,5 mM + Mg^{2+} 3,8 mM: $19,5 \pm 0,8$ mV; $P < 0,001$) y de su duración media (Figura R49B, Ca^{2+} 3 mM + Mg^{2+} 1,3 mM: $20,2 \pm 0,6$ ms; Ca^{2+} 0,5 mM + Mg^{2+} 3,8 mM: $16,1 \pm 0,7$ ms; $P < 0,001$).

La gran reducción en la amplitud de la ADP en el primer grupo de células tras disminuir la concentración extracelular de calcio de 3 a 0,5 mM (Ca^{2+} 3 mM: $26,9 \pm 1,8$ mV; Ca^{2+} 0,5 mM: $15,0 \pm 1,2$ mV) contrastaba con la obtenida en el segundo grupo de células, cuando se redujo la concentración extracelular de calcio pero manteniendo la concentración de iones divalentes, con respecto de la solución extracelular control (Ca^{2+} 3 mM + Mg^{2+} 1,3 mM: $24,1 \pm 0,6$ mV; Ca^{2+} 0,5 mM + Mg^{2+} 3,8 mM: $19,5 \pm 0,8$ mV). Puesto que las células empleadas en cada grupo de experimentos fueron distintas, se repitió el experimento utilizando las mismas células en los dos grupos ($n=2$). En ambas células la reducción de la amplitud y la duración media de la ADP fue similar cuando se perfundieron las rodajas con las dos soluciones extracelulares con baja concentración de calcio, en comparación con la ADP observada al bañar la rodaja con la solución extracelular control (Tabla R15, Figura R50). Por tanto, no parece que la concentración extracelular de iones divalentes influya en la generación de la ADP.

Tabla R15. Valores individuales de los parámetros de la ADP de las dos células registradas con la solución extracelular control (Ca^{2+} 3 mM + Mg^{2+} 1,3 mM), una solución con baja concentración de calcio pero sin alterar la concentración de divalentes (Ca^{2+} 0,5 mM + Mg^{2+} 3,8 mM) y una solución con baja concentración tanto de calcio como de divalentes (Ca^{2+} 0,5 mM + Mg^{2+} 1,3 mM).

Parámetros ADP		Ca^{2+} 3 + Mg^{2+} 1,3 (total 4,3)	Ca^{2+} 0,5 + Mg^{2+} 3,8 (total 4,3)	Ca^{2+} 0,5 + Mg^{2+} 1,3 (total 1,8)
Célula 1	Amplitud (mV)	23,0	17,6	18,7
	Duración media (ms)	18,1	15,4	15
Célula 2	Amplitud (mV)	23,9	18,5	18,5
	Duración media (ms)	20,2	14,7	17,8

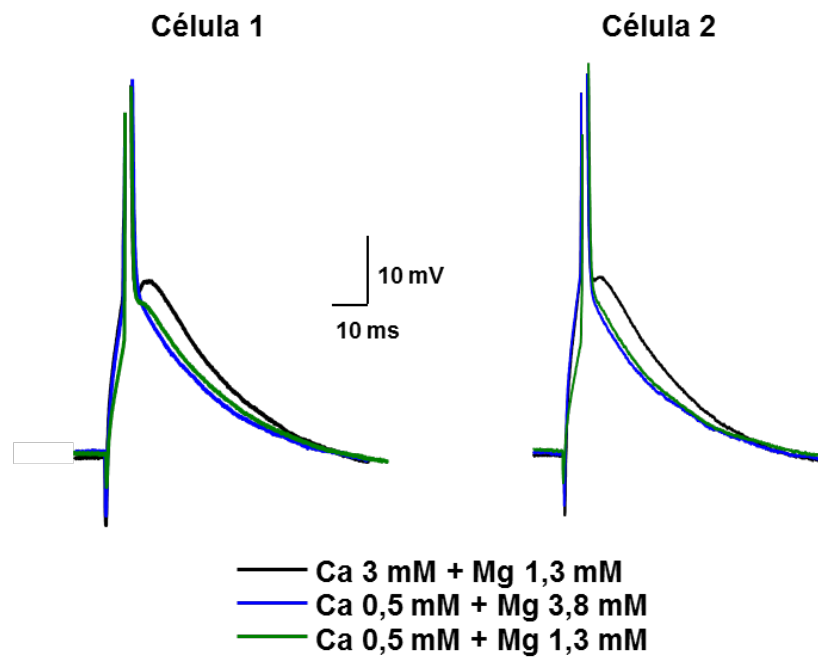


Figura R50. Efectos de la concentración extracelular de calcio sobre la morfología de la ADP

Registros de los PAs generados mediante un pulso de 5 ms de duración e intensidad umbral tras perfundir la rodaja con una solución extracelular con las siguientes concentraciones de iones divalentes: calcio 3 mM + magnesio 1,3 mM (negro), calcio 0,5 mM + magnesio 3,8 mM (azul) y calcio 0,5 mM + magnesio 1,3 mM (verde), en neuronas del grupo P16-19. Se puede observar cómo disminuyó la amplitud y duración media de la ADP al reducir la concentración extracelular de calcio, independientemente de la concentración extracelular de iones divalentes.

Los resultados obtenidos al modificar la concentración extracelular de calcio sugieren que la entrada de calcio tiene un papel importante en la generación de la ADP. Para confirmar la necesidad de la entrada de calcio en la generación de la ADP, se realizó una nueva serie de experimentos utilizando la solución extracelular control (calcio 3 mM + magnesio 1,3 mM). En ellos, se generó un PA mediante un pulso de 5 ms de duración, a intensidad de corriente umbral, tras añadir los bloqueantes de la corriente T de calcio, níquel 500 μ M (N=10 células) o mibefradil 10 μ M (N=6 células), al medio extracelular.

En estas condiciones se observó una reducción de la amplitud y de la duración media de la ADP tras la aplicación en el medio extracelular de níquel 500 μ M (Figura R51A, Amplitud: Control: $27,3 \pm 0,7$ mV, Níquel: $22,4 \pm 0,8$ mV; Duración media: Control: $22,3 \pm 0,9$ ms, Níquel: $17,9 \pm 1,1$ ms; $P < 0,001$ para ambos parámetros) y de mibefradil 10 μ M (Figura R51B, Amplitud: Control: $26,3 \pm 1,9$ mV, Mibefradil: $19,2 \pm 1,1$ mV; Duración media: Control: $22,2 \pm 2,4$ ms, Mibefradil: $18,8 \pm 1,8$ ms; $P < 0,05$ para ambos parámetros).

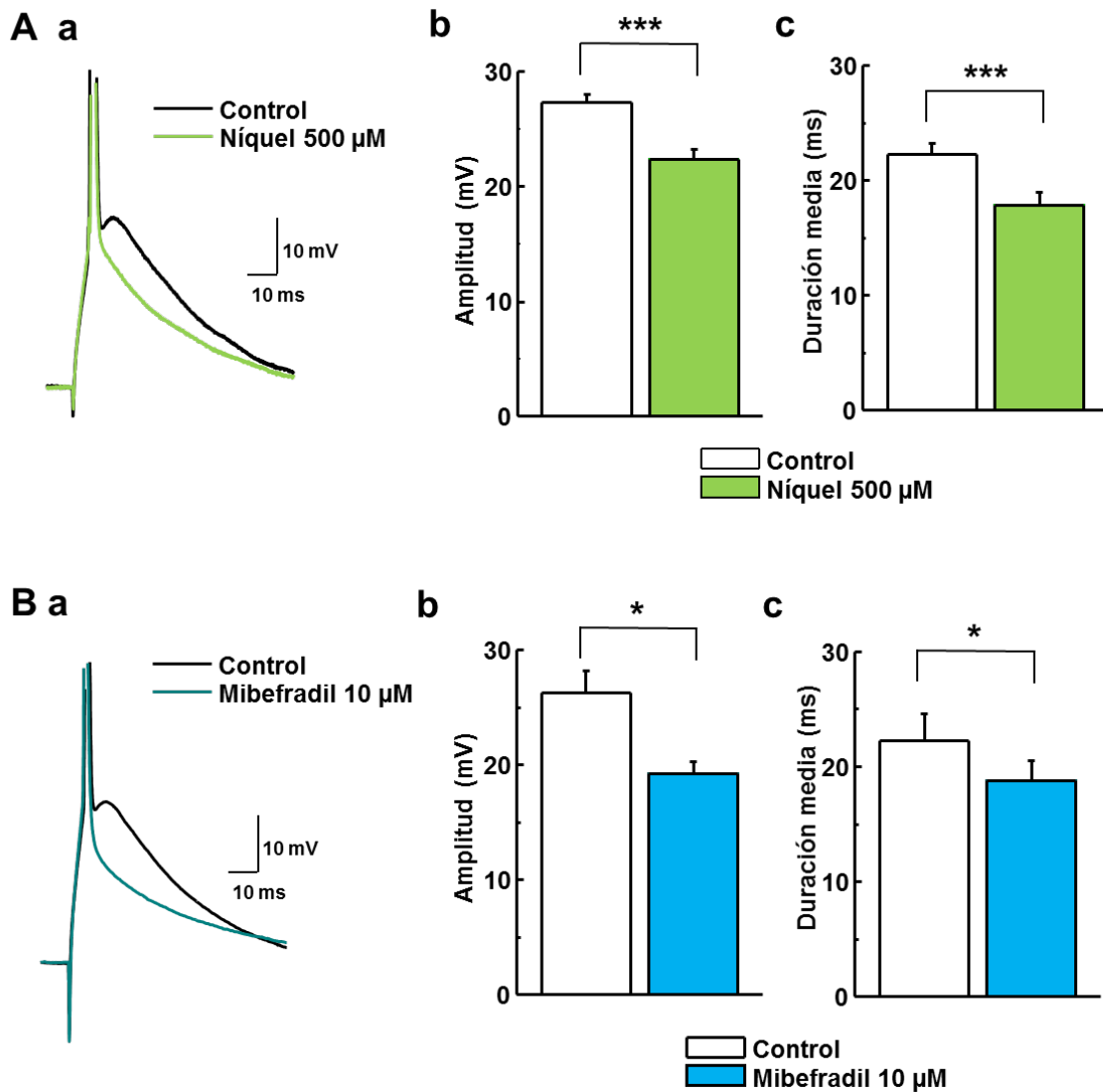


Figura R51: Efectos del bloqueo de la corriente de calcio tipo T sobre la morfología de la ADP.

- A)** Análisis de la morfología de la ADP tras añadir el bloqueante de la corriente de calcio tipo T, níquel (500 μM), a la solución extracelular, en neuronas del grupo P16-19. **Aa)** Registro representativo de un ADP generado tras un PA obtenido mediante un pulso de 5 ms de duración e intensidad umbral en situación control (negro) y tras añadir níquel 500 μM a la solución extracelular (verde). A la derecha se muestran dos gráficos de barras representando los valores promedio de la amplitud de la ADP (**Ab**) y su duración media (**Ac**) en situación control (blanco) y tras añadir níquel 500 μM a solución extracelular (verde). Se puede observar cómo al añadir níquel, se reduce la amplitud y la duración media de la ADP. N=10 células.

Control vs Níquel 500 μM : *** $P < 0,001$.

- B)** Similares resultados a los presentados en el apartado A, pero tras añadir mibefradil (10 μM), a la solución extracelular (azul). N=6 células.

Control vs Mibefradil 10 μM : * $P < 0,05$.

En resumen, todos los resultados obtenidos ponen de manifiesto la importancia de la entrada de calcio para la generación de la ADP. Similares resultados fueron obtenidos previamente en preparaciones similares y a edades similares (Chen et al. 2005; Metz et al. 2005; Sánchez-Alonso et al. 2010). Dado que el trabajo de Su y colaboradores se realizó con ratas adultas (Su et al. 2001), es posible que la importancia de cada una de las corrientes implicadas en la generación de la ADP se vea modificada con el desarrollo, y en el estado adulto tenga un papel poco destacado la corriente tipo T.

3.4. Efecto de la concentración extracelular de calcio sobre la excitabilidad neuronal.

3.4.1. La concentración extracelular de calcio afecta al patrón de disparo de potenciales de acción.

Las neuronas piramidales de CA1 pueden responder ante un estímulo despolarizante mediante un patrón de disparo regular o un patrón de disparo en ráfagas (Kandel & Spencer 1961; Schwartzkroin 1975). El comportamiento intrínseco predominante en las neuronas piramidales de CA1 es el disparo regular (Masukawa et al. 1982; Jarsky et al. 2008; Graves et al. 2012). Sin embargo, en el intervalo de edad estudiado, la implicación de corrientes de calcio como las tipo R y tipo T en la generación de una despolarización post-potencial, permiten el disparo de los PAs con un patrón de ráfagas (Chen et al. 2005; Metz et al. 2005; Sánchez-Alonso et al. 2010). Dada la implicación de estas corrientes en el disparo en ráfagas, y la importancia del calcio para la generación de la ADP en el período comprendido entre los 16 y 19 días de edad postnatal, se estudió el papel del calcio en la modulación del patrón de disparo mediante registros *patch-clamp* en fijación de corriente a potencial de la membrana de -80 mV, a neuronas del grupo P16-19.

En una primera serie de experimentos (N=10 células) se evaluó el patrón de disparo de las neuronas piramidales tras perfundir las rodajas con tres soluciones extracelulares diferentes, que variaban únicamente en su concentración de calcio (3, 1 y 0,5 mM). En la situación control, con una solución extracelular cuya concentración de calcio fue de 3 mM, se observó generalmente un patrón de disparo consistente en una primera ráfaga de 2 o 3 PAs, seguidos por una serie de PAs separados y con frecuencia uniforme (Figura R52), comportamiento similar al observado previamente en estudios de éste (Sánchez-Alonso et al. 2010; Sánchez-Alonso et al. 2012) y otros laboratorios (McCormick et al. 1985; Metz et al. 2005; Yue et al. 2005; Jarsky et al. 2008).

Para clasificar la distribución del patrón de disparo, se seleccionaron registros en los que se generaron entre 4 y 8 PAs en respuesta a un pulso despolarizante de 0,3-1 segundos de duración, y se calcularon los intervalos de tiempo entre cada PA (ISI, *interspike interval*). Posteriormente se determinó el ISI ratio (*interspike interval ratio*) de estos registros, definido como el cociente entre el mínimo ISI del pulso y el valor promedio de todos los ISIs del pulso (Metz et al. 2005). Se consideró un disparo regular cuando el ISI ratio tuvo un valor mayor o

igual a 0,4, y un disparo en ráfaga cuando el ISI ratio fue inferior de 0,4 (ver Material y Métodos). La representación de los ISIs ratio se realizó mediante un gráfico de distribución acumulativa (Figura R52). En él se observa que al disminuir la concentración extracelular de calcio, la distribución acumulativa de los ISIs ratio se desplazó hacia valores mayores ($P < 0,05$, $N = 10$ células, prueba de Kruskal-Wallis). Mientras que en la situación control (concentración extracelular de calcio 3 mM) se aprecia un ISI ratio promedio que se corresponde con un disparo en ráfaga, al disminuir la concentración extracelular de calcio se observa un ISI ratio promedio propio de un disparo regular (Figura R52, Ca^{2+} 3 mM: ISI ratio = $0,22 \pm 0,07$; Ca^{2+} 1 mM: ISI ratio = $0,48 \pm 0,08$; Ca^{2+} 0,5 mM: ISI ratio = $0,56 \pm 0,08$, $P < 0,01$. El ISI ratio promedio obtenido con las concentraciones extracelulares de calcio de 1 mM y 0,5 mM es diferente al obtenido con la concentración de 3 mM - $P < 0,01$ en ambos casos-).

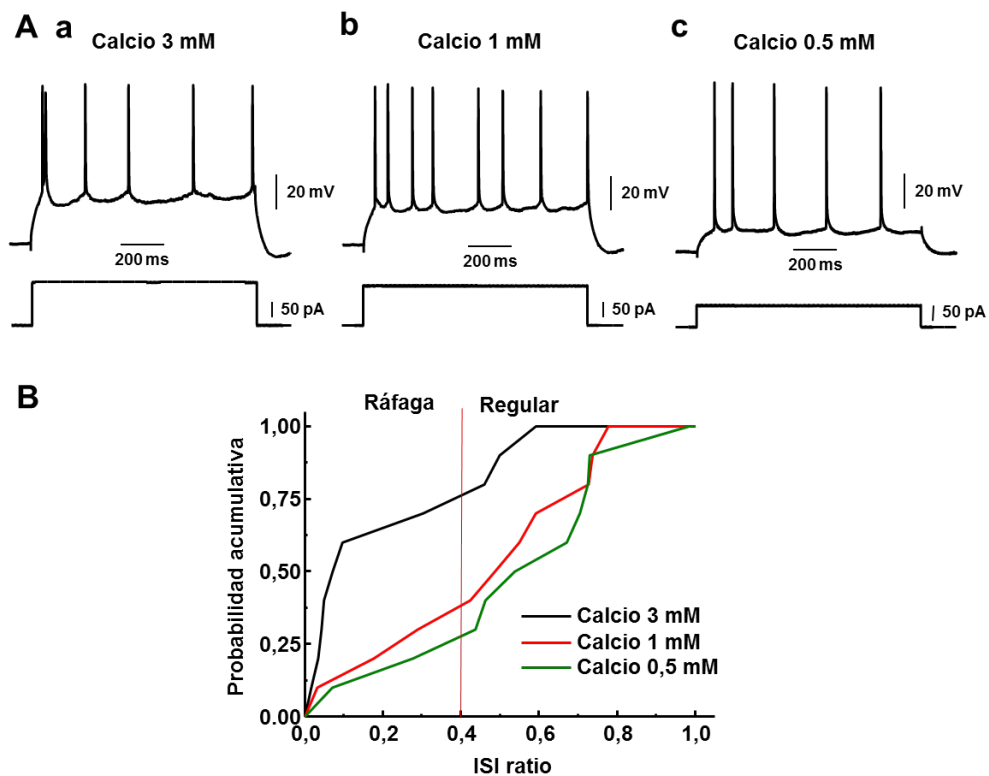
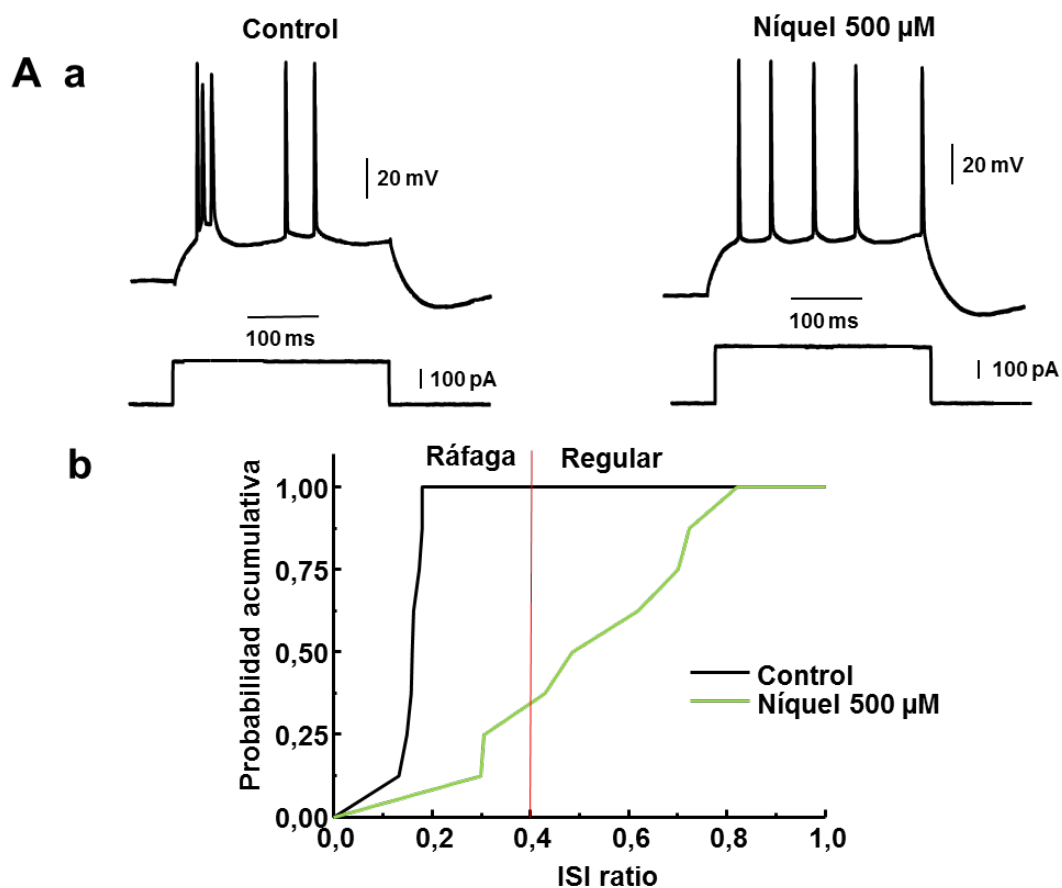


Figura R52: Efectos de la concentración extracelular de calcio sobre el patrón de disparo de PAs en neuronas piramidales de CA1.

- A)** Registros representativos del patrón de disparo obtenido en neuronas piramidales de CA1 con un potencial de fijación de -80 mV, tras emplear tres concentraciones extracelulares de calcio: 3 (Aa), 1 (Ab) y 0,5 (Ac).
- B)** Distribución de probabilidad acumulativa de los ISIs ratio obtenidos tras emplear tres concentraciones extracelulares de calcio: 3 (negro), 1 (rojo) y 0,5 (verde). Se puede apreciar que al emplear la concentración de 3 mM, más de la mitad de las neuronas tienen un ISI ratio correspondiente a un patrón de disparo en ráfaga. Sin embargo, al reducir la concentración extracelular de calcio, se observa un incremento del número de células con un ISI ratio correspondiente a un disparo regular. $N = 10$ células.

En una nueva serie de experimentos, se evaluó el patrón de disparo de las neuronas piramidales antes y después de la aplicación al medio extracelular de los bloqueantes de la corriente T de calcio, níquel 500 μM (N=9 células) o mibefradil 10 μM (N=6 células). Dichos experimentos se realizaron con una solución extracelular de calcio (3 mM) y siguiendo el protocolo y los criterios de clasificación descritos para la primera serie de experimentos. Mediante el gráfico de distribución acumulativa se observa un desplazamiento de los ISIs ratio hacia valores mayores (Níquel: $P<0,01$; Mibefradil: $P<0,05$, prueba de Kruskal-Wallis). Mientras que en la situación control se aprecia un ISI ratio promedio correspondiente con un disparo en ráfaga, al añadir níquel (500 μM) o mibefradil (10 μM) se observa un ISI ratio promedio propio de un disparo regular (Figura R53, Control antes de níquel: ISI ratio = $0,16 \pm 0,01$; Níquel: ISI ratio = $0,50 \pm 0,08$; N=10, $P<0,01$; Control antes de mibefradil: ISI ratio = $0,31 \pm 0,10$; Mibefradil: ISI ratio = $0,69 \pm 0,03$, $P<0,05$).



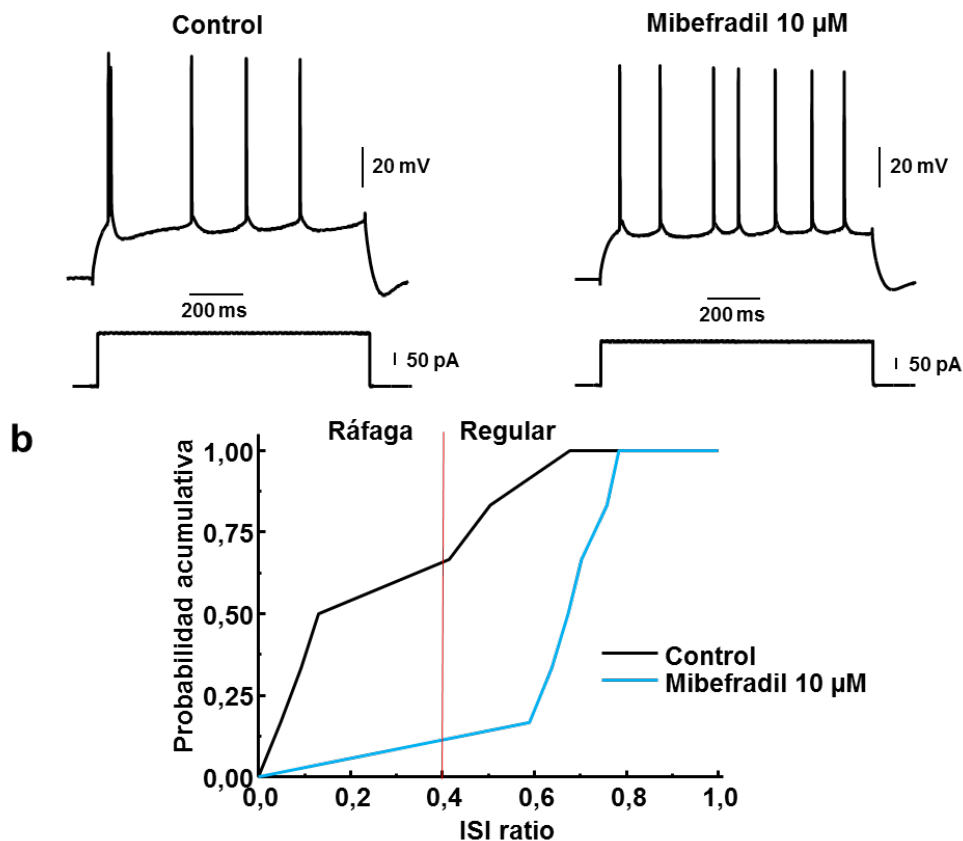
B a

Figura R53: Efectos del bloqueo de la corriente de calcio tipo T sobre el patrón de disparo de los PAs.

- A)** **Aa)** Registros representativos del patrón de disparo a un potencial de fijación de -80 mV, en situación control (izquierda) y tras añadir níquel 500 μ M a la solución extracelular (derecha). **Ab)** Distribución de probabilidad acumulativa de los ISIs ratio observados en situación control (negro) y tras añadir níquel 500 μ M a la solución extracelular (verde). Se puede observar que las neuronas registradas presentan un patrón de disparo en ráfaga, pero tras la aplicación del níquel se convierte en regular. N=9 células.
- B)** **Ba)** Registros representativos del patrón de disparo a un potencial de fijación de -80 mV, en situación control (izquierda) y tras añadir mibefradil 10 μ M a la solución extracelular (derecha). **Bb)** Distribución de probabilidad acumulativa de los ISIs ratio observados en situación control (negro) y tras añadir mibefradil 10 μ M a la solución extracelular (azul). Se puede observar que las neuronas registradas presentan un patrón de disparo en ráfaga, pero tras la aplicación de mibefradil se convierte en regular. N=6 células.

Los resultados obtenidos, tanto modificando la concentración extracelular de calcio como con la aplicación de bloqueantes, muestran que la entrada de calcio extracelular es importante para el desarrollo de un patrón de disparo en ráfaga.

3.4.2. La concentración extracelular de calcio afecta a la frecuencia de disparo de potenciales de acción.

Los resultados presentados en la sección 3.2 demostraban que la disminución de la concentración de iones divalentes producía una hiperpolarización del umbral de disparo debido a un desplazamiento a la izquierda de la curva de activación de los canales implicados en la corriente transitoria de sodio (Hille 2001). Como consecuencia, a medida que disminuye la concentración extracelular de calcio, sin compensar la reducción de divalentes, se esperaría un incremento de la frecuencia de disparo de los PAs en respuesta a estímulos de igual intensidad.

Para verificar esta hipótesis se realizaron registros de *patch-clamp* en fijación de corriente a potencial de la membrana de -80 mV en neuronas del grupo P16-19. En una primera serie de experimentos ($N=10$ células), se emplearon tres soluciones extracelulares diferentes, que variaban únicamente en su concentración de calcio (3, 1 y 0,5 mM). Posteriormente se aplicó una serie de pulsos cuadrados de corriente despolarizante, de 1 segundo de duración a intensidades de corriente creciente (con incrementos de 20 pA, desde los 0 pA hasta los 500 pA), y se construyeron curvas de entrada-salida para cada una de las soluciones extracelulares en las que se representó la frecuencia de disparo de los PAs frente a la intensidad de corriente inyectada.

Al disminuir la concentración extracelular de calcio se observa un desplazamiento a la izquierda de la curva de entrada-salida: en respuesta a pulsos de igual intensidad de corriente, la frecuencia de disparo de PAs se incrementa al disminuir la concentración extracelular de calcio (Figura R54, $P<0,001$ para el factor concentración de calcio). Este resultado es consistente con el desplazamiento a la izquierda de la curva de activación de la corriente transitoria de sodio por una disminución en la concentración extracelular de iones divalentes (Hille 2001).

Sin embargo, para intensidades de corriente elevadas, se aprecia un bloqueo del disparo de los PAs al disminuir la concentración extracelular de calcio (Figura R54, puede observarse en la gráfica de entrada-salida cómo a partir de los 350 pA disminuye la frecuencia de los PAs cuando la concentración extracelular de calcio es de 0,5 mM). En este bloqueo puede influir el desplazamiento hacia la izquierda de las curvas de activación e inactivación de la corriente transitoria de sodio, la corriente tipo A de potasio y otras corrientes rectificadoras retardadas de potasio producido por la disminución de iones divalentes (Hahin & Campbell 1983; Mayer & Sugiyama 1988; Hille 2001), y la menor activación de corrientes de potasio

dependientes de calcio, las cuales son de gran importancia en la repolarización del PA durante un disparo repetitivo de alta frecuencia (Storm 1987; Ma & Koester 1996; Berkefeld et al. 2010).

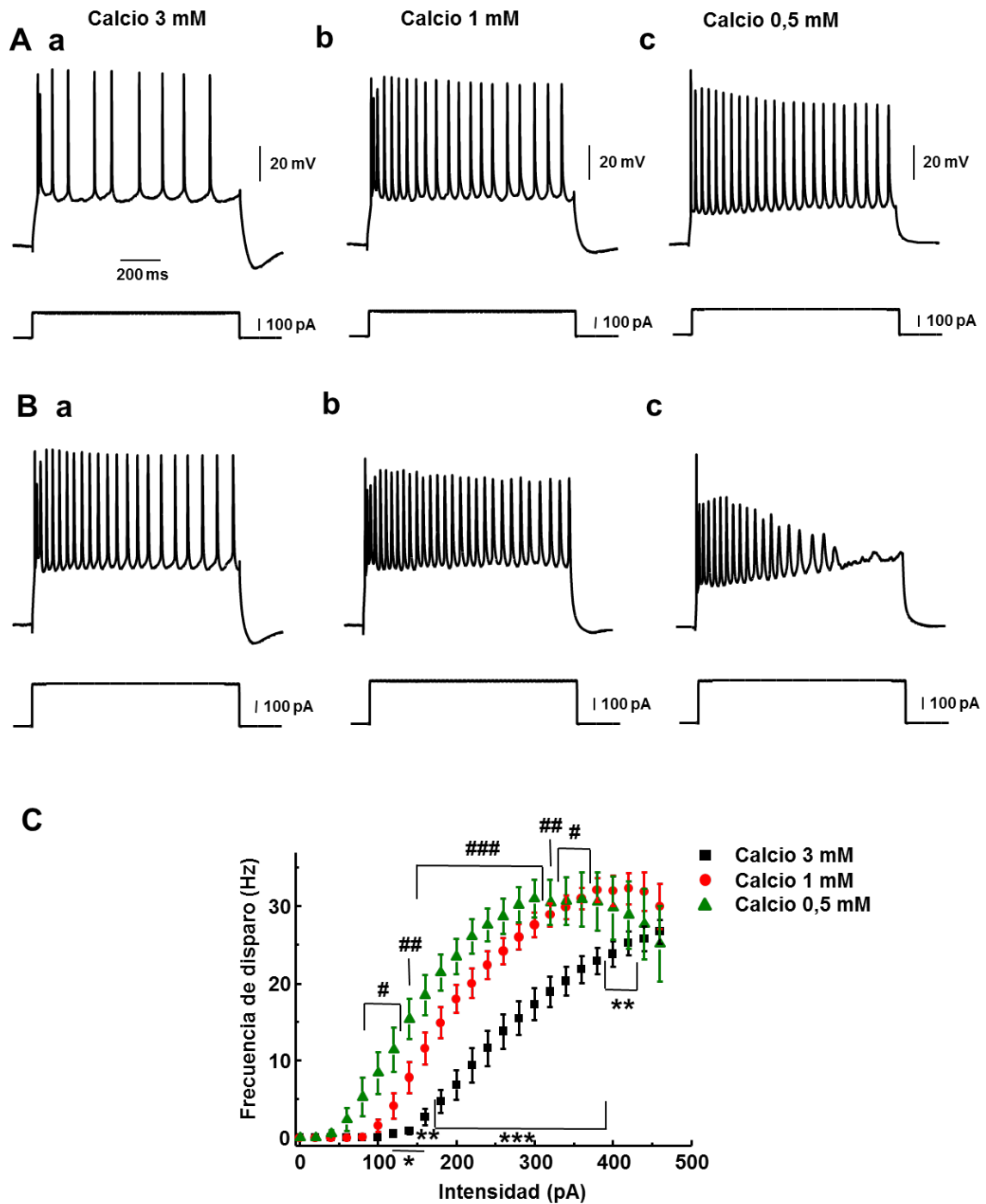


Figura R54: Efectos de la concentración extracelular de calcio sobre la frecuencia de disparo.

- A)** Registros representativos en los que se muestra el disparo de PAs en respuesta a un pulso despolarizante de 1 s de duración a una intensidad de 200 pA, tras emplear soluciones con tres concentraciones de calcio: 3 (Aa), 1 (Ab) y 0,5 (Ac).
- B)** Registros representativos en los que se muestra el disparo de PAs en respuesta a un pulso despolarizante de 1 s de duración a una intensidad de 340 pA, tras emplear soluciones con tres concentraciones de calcio: 3 (Ba), 1 (Bb) y 0,5 mM (Bc).
- C)** Curva de entrada-salida que relaciona el promedio de la frecuencia de disparo con la intensidad de corriente inyectada, tras emplear soluciones con tres concentraciones de calcio: 3 (cuadrados negros), 1 (círculos rojos) y 0,5 mM (triángulos verdes). Se observa cómo aumenta la frecuencia de disparo al disminuir la concentración extracelular de calcio. También se aprecia cómo para intensidades de corriente elevadas (superiores a los 300 pA), comienza a disminuir la frecuencia de disparo cuando se emplea la solución extracelular con calcio 0,5 mM, debido a un bloqueo en la generación de PAs. Con la solución de 1 mM se observa el bloqueo con intensidades más elevadas (en torno a los 450 pA). N=10 células.

Calcio 3 mM vs Calcio 1 mM: * $P < 0,05$ (120-140 pA), ** $P < 0,01$ (160,400-420 pA), *** $P < 0,001$ (180-300 pA).

Calcio 1 mM vs Calcio 0,5 mM: # $P < 0,05$ (100-120, 340-360 pA), ## $P < 0,01$ (140, 320 pA), ### $P < 0,001$ (160-300 pA).

Calcio 1 mM vs Calcio 0,5 mM: \$ $P < 0,05$ (140-240 pA).

A fin de comprobar que el incremento en la excitabilidad observado tras la disminución en la concentración extracelular de calcio está relacionado con que el calcio es un ion divalente, se realizó otra serie de experimentos en los que se modificaron las concentraciones extracelulares de calcio y de magnesio (N=5 células). De modo que se emplearon tres nuevas soluciones: una con 3 mM de calcio y 1,3 mM de magnesio (4,3 mM de divalentes), otra con 0,5 mM de calcio y 3,8 mM de magnesio (4,3 mM de divalentes), y una tercera con 0,5 mM de calcio y 1,3 mM de magnesio (1,8 mM de divalentes). Posteriormente se aplicó una serie de pulsos cuadrados de corriente despolarizante, de 1 segundo de duración a intensidades de corriente creciente (en este caso con incrementos de 50 pA, desde los 0 pA hasta los 700 pA, con el fin de observar también el bloqueo por despolarización), y se construyeron nuevas curvas de entrada-salida de modo similar al descrito anteriormente.

La curva de entrada-salida se comporta de forma diferente cuando disminuye la concentración extracelular de iones divalentes (calcio 0,5 mM y magnesio 1,3 mM), con respecto de las obtenidas cuando se usaron las dos disoluciones con una concentración total de divalentes de 4,3 mM (Figura R55, $P < 0,01$ para el factor solución extracelular. El análisis *a posteriori* mediante la prueba de Bonferroni muestra diferencias entre la solución con concentración de divalentes 1,8 mM y las dos soluciones con concentración de divalentes 4,3

mM – $P < 0,01$ con respecto de la solución control, y $P < 0,05$ con respecto de la que contenía Ca^{2+} 0,5 mM + Mg^{2+} 3,8 mM -, no existen diferencias entre las disoluciones con una concentración de divalentes de 4,3 mM, $P = 0,971$). Analizando la gráfica de entrada-salida con más detalle se puede observar:

- En respuesta a pulsos de una intensidad de corriente inferior a 400 pA, la frecuencia de disparo para una misma intensidad es mayor cuando disminuye la concentración extracelular de iones divalentes con respecto de la frecuencia de disparo observada con la solución extracelular control. Sin embargo, al compensar la reducción de calcio con un incremento de magnesio, manteniendo constante la concentración de iones divalentes, no se aprecian diferencias en la frecuencia de disparo, con respecto de la frecuencia de disparo observada con la solución extracelular control.
- En respuesta a pulsos de una intensidad de corriente superior a 350 pA, comenzó a disminuir la frecuencia de disparo de PAs cuando se perfundió la solución extracelular con baja concentración de divalentes, siendo esta disminución muy notoria a partir de intensidades de 600 pA. Sin embargo, tras administrar la solución extracelular con baja concentración de calcio, pero sin alterar la concentración de iones divalentes, se necesitó una intensidad de corriente en torno a 600 pA).

Los resultados obtenidos muestran un aumento de la excitabilidad neuronal al disminuir la concentración extracelular de calcio debido a su condición de ion divalente, desplazando la curva de activación de la corriente transitoria de sodio hacia potenciales de la membrana más negativos (Hille, 2001). Además, cuando disminuyó la concentración extracelular de calcio se observa un bloqueo en la generación de PAs debido a la despolarización de la membrana en respuesta a pulsos de elevada intensidad de corriente. La dependencia de voltaje de este bloqueo está relacionada con una disfunción de las corrientes repolarizantes de potasio dependientes de calcio como la tipo BK al disminuir la concentración extracelular de calcio (Ma y Koester, 1996; Berkefeld et al., 2010), junto a un desplazamiento hacia la izquierda de las curvas de activación e inactivación de la corriente transitoria de sodio, la corriente tipo A de potasio y otras corrientes rectificadoras retardadas de potasio (Hahn y Campbell, 1983; Mayer y Sugiyama, 1988; Hille, 2001).

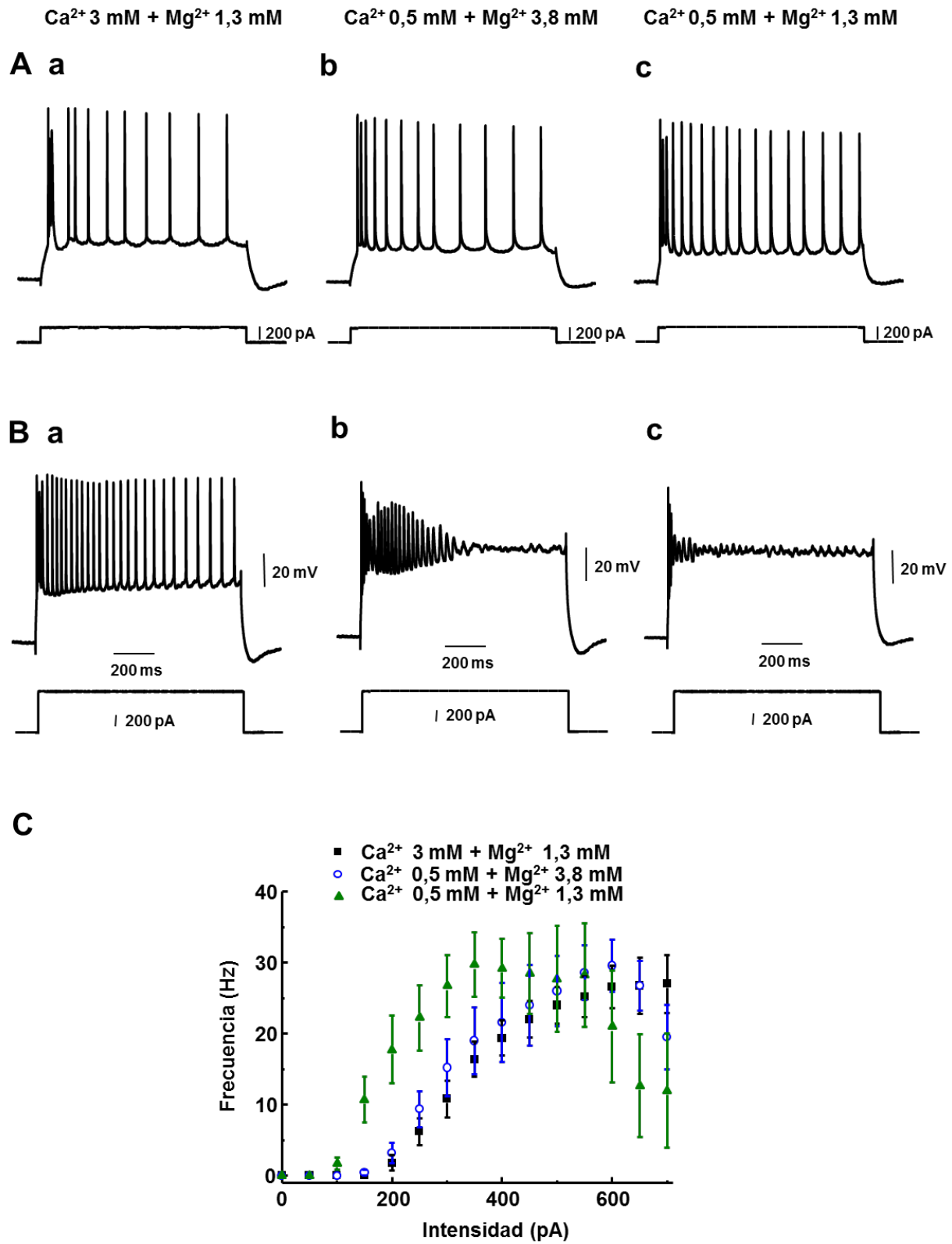
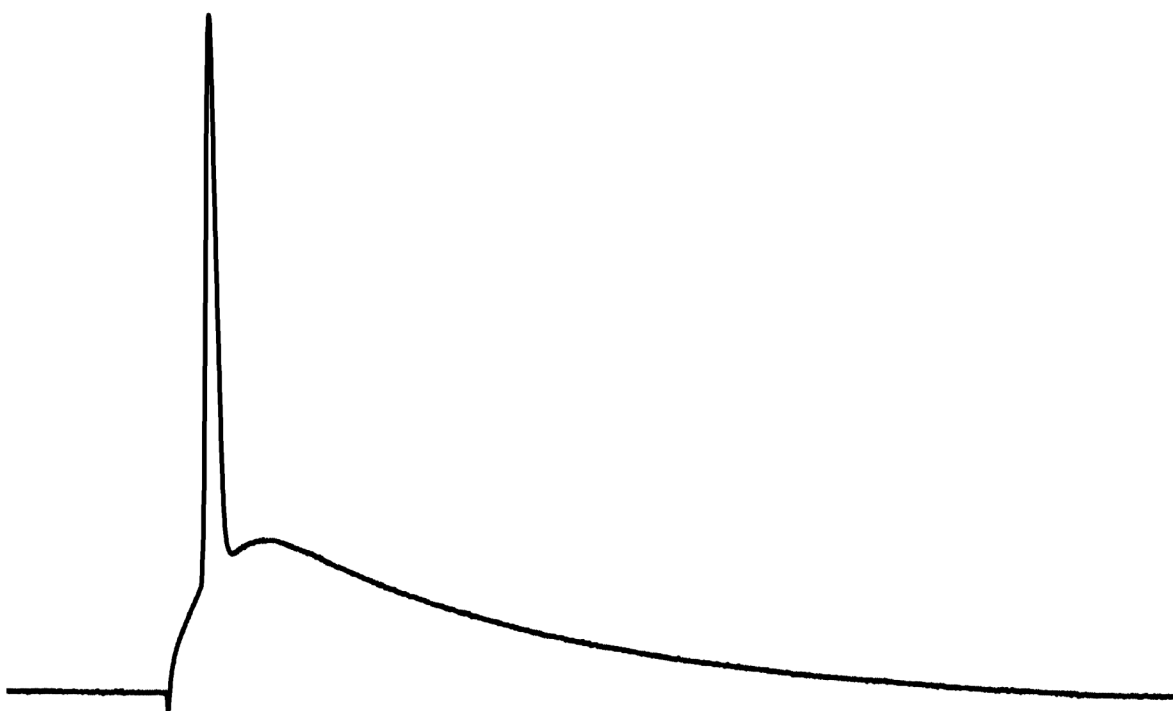


Figura R55: Efectos de la concentración extracelular de iones divalentes sobre la frecuencia de disparo.

- A)** Registros representativos en los que se muestra el disparo de PAs en respuesta a un pulso despolarizante de 1 s de duración a una intensidad de 250 pA, tras emplear soluciones con tres concentraciones de iones divalentes: calcio 3 mM + magnesio 1,3 mM (**Aa**), calcio 0,5 mM + magnesio 3,8 mM (**Ab**) y calcio 0,5 mM + magnesio 1,3 mM (**Ac**).
- B)** Registros representativos en los que se muestra el disparo de PAs en respuesta a un pulso despolarizante de 1 s de duración a una intensidad de 700 pA, tras emplear soluciones con tres concentraciones de iones divalentes: calcio 3 mM + magnesio 1,3 mM (**Aa**), calcio 0,5 mM + magnesio 3,8 mM (**Ab**) y calcio 0,5 mM + magnesio 1,3 mM (**Ac**).
- C)** Curvas de entrada-salida que relacionan el promedio de la frecuencia de disparo frente a la corriente inyectada tras emplear una solución extracelular cuya concentración de iones divalentes fue: calcio 3 mM + magnesio 1,3 mM (cuadrados negros), calcio 0,5 mM + magnesio 3,8 mM (círculos azules) y calcio 0,5 mM + magnesio 1,3 mM (triángulos verdes). Se observa cómo para intensidades de corriente inferiores a los 400 pA, aumentó la frecuencia de disparo al disminuir la concentración extracelular de divalentes. También se aprecia que disminuye la frecuencia de disparo debido a un bloqueo en la generación de los PAs a intensidades de corriente superiores a 400 pA cuando se empleó la solución (calcio 0,5 mM + magnesio 1,3 mM), y a intensidades de corriente en torno a los 600 pA, cuando se usó la solución (calcio 0,5 mM + magnesio 3,8 mM). N=5 células.

DISCUSIÓN



1. Evolución de la excitabilidad intrínseca de las neuronas piramidales de CA1 durante las primeras etapas del desarrollo postnatal.

1.1. Las propiedades pasivas de la membrana cambian durante el desarrollo postnatal.

Las neuronas piramidales del hipocampo de rata sufren considerables cambios en sus propiedades electrofisiológicas y morfológicas durante el primer mes de desarrollo postnatal (Pokorny & Yamamoto 1981a; Pokorny & Yamamoto 1981b; Schwartzkroin & Kunkel 1982; Spigelman et al. 1992). En las neuronas registradas en la tesis, durante el desarrollo se observa un aumento de la capacidad de la membrana (Tabla R1), similar al descrito previamente por otros autores (Potthoff & Dietzel 1997; Vasilyev & Barish 2002; Surges et al. 2006; Sánchez-Alonso et al. 2010; Sánchez-Alonso et al. 2012). Este parámetro está directamente relacionado con la superficie de la membrana plasmática (Hille 2001; Giglio & Storm 2014). Por lo tanto, el aumento de la capacidad podría ser debido al considerable aumento que se observa en la superficie de la membrana de las neuronas piramidales de CA1 durante el primer mes de desarrollo postnatal, como consecuencia del gran crecimiento del árbol dendrítico y de sus conexiones sinápticas que se producen en este período de tiempo (Pokorny & Yamamoto 1981a; Pokorny & Yamamoto 1981b; Schwartzkroin & Kunkel 1982; Liao et al. 1999; Groc et al. 2003).

Además, en las neuronas registradas en la tesis disminuye la resistencia de la membrana durante el desarrollo (Tabla R1, Figura R1). Resultados similares han sido descritos por otros autores (McCormick & Prince 1987; Zhang et al. 1991; Spigelman et al. 1992; Isagai et al. 1999; Sánchez-Alonso et al. 2010; Sánchez-Alonso et al. 2012; Giglio & Storm 2014). Dado que la resistencia de la membrana está inversamente relacionada con la superficie de la membrana plasmática, el crecimiento del árbol dendrítico por sí mismo podría explicar la disminución de la resistencia de la membrana durante el desarrollo (McCormick & Prince 1987). Sin embargo, la disminución observada en la constante de tiempo de la membrana durante el desarrollo (Tabla R1, Figura R1), descrita también por otros autores (McCormick & Prince 1987; Zhang et al. 1991; Spigelman et al. 1992; Sánchez-Alonso et al. 2012), sugiere que la resistividad específica de las neuronas registradas en la tesis pudo disminuir durante el desarrollo, probablemente debido a un incremento en la densidad de canales iónicos expresados en la membrana plasmática (McCormick

& Prince 1987; Spigelman et al. 1992). De acuerdo con esta hipótesis, diversos autores han observado un incremento de la corriente de potasio tipo M y de la corriente catiónica tipo H durante el período de edad empleado durante la tesis (Vasilyev & Barish 2002; Surges et al. 2006; Safiulina et al. 2008). Los canales que generan estas dos corrientes (KCNQ y HCN respectivamente) tienen una activación lenta en torno a voltajes próximos al potencial de la membrana en reposo, y no se inactivan a los potenciales de la membrana fisiológicamente relevantes, por lo que tienen un papel fundamental en el control de la resistencia de la membrana (Lüthi & McCormick 1998; Lamas et al. 2002; Peters et al. 2005; Brown & Passmore 2009; Lewis et al. 2010). Las corrientes de fuga independientes de voltaje condicionan también la resistencia de la membrana (Lamas et al. 2002). Por tanto, un incremento de las corrientes tipo H y tipo M o de las corrientes de fuga podría contribuir a la disminución de la resistencia y la constante de tiempo de la membrana observadas durante el desarrollo postnatal.

Por último, en esta tesis se observa una hiperpolarización del potencial de la membrana en reposo durante el desarrollo (Tabla R1), también descrita por otros autores (McCormick & Prince 1987; Spigelman et al. 1992; Isagai et al. 1999; Sánchez-Alonso et al. 2012; Giglio & Storm 2014). En el mantenimiento del potencial de reposo tienen un papel principal las corrientes de fuga (fundamentalmente de potasio) y las corrientes tipo H y tipo M (Lüthi & McCormick 1998; Patel & Honoré 2001; Lamas et al. 2002; Peters et al. 2005; Shah et al. 2008; Brown & Passmore 2009; Lewis et al. 2010; Mathie et al. 2010). Además, Lamas y colaboradores observaron una despolarización del potencial de reposo de 3 mV al bloquear la bomba Na^+/K^+ (Lamas et al. 2002), y se ha descrito un aumento de la actividad de la bomba durante las cinco primeras semanas (Fukuda & Prince 1992; Skov et al. 2006). Por tanto, un incremento en las corrientes de fuga, en la corriente tipo M o en la actividad de la bomba Na^+/K^+ podría explicar la hiperpolarización del potencial de reposo durante el desarrollo postnatal.

1.2. La morfología del potencial de acción cambia durante el desarrollo postnatal.

En respuesta a un pulso corto

Durante las primeras semanas del desarrollo postnatal, diversos autores han descrito la maduración de algunas de las corrientes implicadas en la generación de PAs en las neuronas piramidales de CA1: un incremento en las corrientes persistente y transitoria de sodio (Costa

1996; Potthoff & Dietzel 1997; Lunko et al. 2014), una disminución de las corriente de potasio tipo A (Klee et al. 1995; Sánchez-Alonso et al. 2012), y un aumento de la corriente de potasio tipo D (Sánchez-Alonso et al. 2012; Giglio & Storm 2014), de otras corrientes de potasio rectificadoras retardadas (Costa et al. 1994; Klee et al. 1995) y de la corriente de potasio tipo BK (Aoki & Baraban 2000). La maduración de estas corrientes conlleva cambios en la morfología del PA. En esta tesis, se observó durante el desarrollo: una hiperpolarización del umbral de disparo, un incremento en la amplitud y un incremento en la duración media del PA, relacionados con un aumento de la velocidad de despolarización y una disminución de la velocidad de repolarización (Tabla R2, Figura R2, aunque también se observa en las Tablas R3-R5 cuando se presentan los datos del primer PA del tétanos).

El incremento de la duración media y la disminución de la velocidad de repolarización observadas en esta tesis durante el desarrollo se pueden explicar por una distinta contribución de las corrientes de potasio. Durante el desarrollo, diversos autores han descrito:

- Una disminución de la corriente tipo A, una corriente de potasio cuya activación es muy rápida, debido a una disminución en la expresión de los canales Kv4.2 y Kv4.3 (Klee et al. 1995; Sánchez-Alonso et al. 2012).
- Un incremento de otras corrientes de potasio con cinéticas de activación más lentas, como la tipo BK (con un aumento en la densidad de canales BK y un desplazamiento de la curva de activación hacia la izquierda) y otras corrientes de potasio rectificadoras retardadas (con un aumento en la expresión del canal Kv2.1) (Costa et al. 1994; Klee et al. 1995; Kang et al. 1996a; Kang, et al. 1996b; Aoki & Baraban 2000; Antonucci et al. 2001; MacDonald et al. 2006; Guan et al. 2011).

Como consecuencia, la contribución de la corriente tipo A en la repolarización de los PAs estudiados en la tesis es muy grande en neuronas inmaduras (como las del grupo de edad P9-12 empleadas en la tesis), y disminuye durante el desarrollo a favor de las otras corrientes de potasio mencionadas (Spigelman et al. 1992; Mitterdorfer & Bean 2002; Sánchez-Alonso et al. 2012), provocando un incremento en la duración del PA debido a una disminución de la velocidad de repolarización. Sin embargo, los resultados de la tesis contrastan con los publicados por otros autores, que describieron un decremento en la duración de los PAs durante el desarrollo postnatal, acompañado por un incremento en la velocidad de repolarización (McCormick & Prince 1987; Spigelman et al. 1992; Baraban & Schwartzkroin 1997; Isagai et al. 1999; Sánchez-Alonso et al. 2010). Esta discrepancia en los resultados es debida a que en dichos estudios se indujo el PA

desde el potencial de la membrana en reposo de la neurona o mediante pulsos despolarizantes de baja intensidad. En esas condiciones la corriente tipo A, con una cinética de inactivación rápida y cuya activación se produce a potenciales subumbrales (Connor & Stevens 1971b; Mitterdorfer & Bean 2002; Sánchez-Alonso et al. 2012), se encontraba parcialmente inactiva, por lo que en las neuronas inmaduras presentaban un PA de mayor duración, mientras que en las neuronas más maduras, la morfología del PA era de menor duración debido a la menor participación de la corriente A, en favor de otras corrientes de potasio con cinéticas de inactivación más lentas, como las corrientes tipo D, otras corrientes de potasio rectificadoras retardadas y la corriente tipo BK (Costa et al. 1994; Klee et al. 1995; Aoki & Baraban 2000; Sánchez-Alonso et al. 2012; Giglio & Storm 2014). No obstante, Spigelman y colaboradores demostraron que el PA generado tras hiperpolarizar el potencial de la membrana disminuía su duración considerablemente en las neuronas más inmaduras, mientras que en las más desarrolladas apenas se veía modificado (siendo éste de mayor duración que el obtenido en las neuronas inmaduras) (Spigelman et al. 1992). Asimismo, en un estudio previo de este laboratorio se demostró que a potencial de la membrana fijado en -80 mV, la duración media del PA generado en neuronas del grupo P9-12 mediante un pulso de baja intensidad era aproximadamente un 70 % mayor que la del PA generado por un pulso de alta intensidad, mientras que en neuronas del grupo P16-19 el aumento de la duración media producido en el PA generado por el pulso de baja intensidad fue sólo de un 10 % (Sánchez-Alonso et al. 2012).

El aumento de la amplitud del PA y el incremento de la velocidad de despolarización, observados durante el desarrollo en las neuronas registradas en la tesis, ha sido descrito por otros autores en neuronas piramidales de CA1 y de otras áreas (McCormick & Prince 1987; Zhang et al. 1991; Spigelman et al. 1992; Isagai et al. 1999; Sánchez-Alonso et al. 2010; Sánchez-Alonso et al. 2012). La evolución de estos parámetros durante el desarrollo se podría explicar por el incremento de la corriente transitoria de sodio durante el primer mes de desarrollo postnatal (Huguenard et al. 1988; Costa 1996; Potthoff & Dietzel 1997), ligado a un incremento en la expresión del canal Nav1.6 en los nodos de Ranvier y en el segmento inicial axónico (Boiko et al. 2001; Boiko et al. 2003). Además, a lo largo de esta tesis se ha observado un incremento de la amplitud en el grupo de edad P9-12 (pero no en los grupos P16-19 y P30-50) tras inactivar parte de la corriente de potasio tipo A, (Figuras R5-R6: inactivación acumulativa por tétanos de frecuencia elevada; Figura R13 y R15: inactivación por una despolarización subumbral). Trabajos previos mostraron el mismo resultado en neuronas inmaduras (Spigelman et al. 1992; Sánchez-Alonso et al. 2012) y en PAs dendríticos de neuronas adultas (Hoffman et al. 1997).

Mitterdorfer y Bean demostraron que la corriente tipo A de potasio aparecía al final de la fase despolarizante, a los 0,42 ms desde el comienzo del PA, y tardaba otros 0,46 ms en alcanzar el máximo (Mitterdorfer & Bean 2002). Si se compara este tiempo de activación de la corriente tipo A con el tiempo que necesitaron los PAs registrados en esta tesis para alcanzar su amplitud máxima (P9-12: $0,79 \pm 0,01$ ms, N=36 células; P16-19: $0,70 \pm 0,01$ ms, N=24 células; P30-50: $0,71 \pm 0,03$ ms, N=4 células, $P < 0,001$). El análisis *a posteriori* mediante la prueba de Bonferroni mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos P9-12 y P16-19, $P < 0,001$), el final de la fase despolarizante de los PAs registrados podría estar regulada por la corriente de potasio tipo A, además de por la corriente transitoria de sodio (y por tanto la amplitud del PA y su velocidad de despolarización estarían determinadas por la magnitud de cada una de las corrientes). En consecuencia, los resultados descritos en esta tesis sugieren que el aumento de la amplitud del PA y el incremento de la velocidad de despolarización durante el desarrollo puede deberse al incremento de la corriente transitoria de sodio y a la disminución de la corriente A que han descrito otros autores (Huguenard et al. 1988; Klee et al. 1995; Costa 1996; Potthoff & Dietzel 1997; Sánchez-Alonso et al. 2012).

Por último, en las neuronas registradas en la tesis se observa una hiperpolarización del umbral de disparo durante el desarrollo, comportamiento similar al descrito previamente en estudios de éste y otros laboratorios (Isagai et al. 1999; Sánchez-Alonso et al. 2010; Sánchez-Alonso et al. 2012; Giglio & Storm 2014). Esta hiperpolarización del umbral de disparo podría ser debida al incremento de la corriente transitoria de sodio que se ha descrito durante el desarrollo postnatal, junto a un desplazamiento de su curva de activación hacia la izquierda (Costa 1996; Potthoff & Dietzel 1997). Además, la corriente tipo A de potasio también despolariza el umbral de disparo (Hoffman et al. 1997; Kim et al. 2005), por lo que la disminución de esta corriente durante el desarrollo postnatal también contribuiría a hiperpolarizar el umbral de disparo (Klee et al. 1995; Sánchez-Alonso et al. 2012).

En respuesta a un tétanos

Durante un tétanos se modifica la morfología del PA debido a una activación de los canales dependientes de calcio y a una inactivación de los canales dependientes de voltaje (Ma & Koester 1996; Kim et al. 2005; Gu et al. 2007; Gittis et al. 2010; Kim 2014).

El efecto más destacado es un incremento de la duración del PA debido a una inactivación progresiva de las corrientes de potasio (Ma & Koester 1996; Giese et al. 1998; Shao et al. 1999; Kim et al. 2005; Gu et al. 2007; Gittis et al. 2010; Kim 2014), siendo muy

acusada la inactivación de la corriente de potasio tipo A (Ma & Koester 1996; Kim et al. 2005; Gu et al. 2007). En las neuronas piramidales de CA1 registradas en la tesis se observa un incremento en la duración media del PA y una disminución de su velocidad de repolarización durante el tétanos. Además, el incremento en la duración aumenta con la frecuencia del tétanos, y la magnitud del mismo disminuye durante el desarrollo (Figura R4). Estas diferencias entre los grupos P9-12 y P16-19 fueron muy acusadas al administrar un tétanos de 50 Hz:

- En el grupo P9-12, en el que la corriente de potasio tipo A es fundamental para la repolarización del PA (Spigelman et al. 1992; Mitterdorfer & Bean 2002; Sánchez-Alonso et al. 2012), se observa un aumento de la duración media y una disminución de la velocidad de repolarización de gran magnitud y con una evolución exponencial durante todo el tétanos debido a la inactivación acumulativa que sufre esta corriente durante el tétanos (Ma & Koester 1996; Kim et al. 2005; Gu et al. 2007).
- En el grupo P16-19, la corriente tipo A disminuye y aumentan otras corrientes de potasio con cinéticas de inactivación más lentas como las corrientes tipo BK, tipo D, y otras corrientes rectificadoras retardadas (Storm 1988; Costa et al. 1994; Kang et al. 1996a; Kang, et al. 1996b; Aoki & Baraban 2000; Sánchez-Alonso et al. 2012; Berkefeld & Fakler 2013; Giglio & Storm 2014). En las neuronas registradas en la tesis se produce un cambio en la duración media y en la velocidad de repolarización del segundo PA del tétanos, con respecto del primero, similar al observado en el grupo P9-12, pero de menor magnitud. Este menor efecto en el grupo P16-19 puede ser debido a una mayor contribución de las corrientes de potasio tipo BK, tipo D y de otras corrientes rectificadoras retardadas en la fase repolarizante. A partir del segundo PA, los cambios en estos parámetros siguen un comportamiento lineal de baja pendiente, ya que la entrada de calcio tras la generación de cada PA provoca un incremento de las corrientes de potasio dependientes de calcio (Ma & Koester 1996; Berkefeld et al. 2010) como la BK, que compensan la inactivación de la corriente A. Otros autores demostraron la importancia de los canales BK y los canales Kv2 para disminuir el incremento en la duración de los PAs producido por un disparo de alta frecuencia (Du et al. 2000; Gu et al. 2007; Gittis et al. 2010; Liu & Bean 2014).

La Figura D1 muestra un esquema adaptado del trabajo de Ma y Koester (1996) en el que se aprecia la implicación de las distintas corrientes en el incremento en la duración del PA.

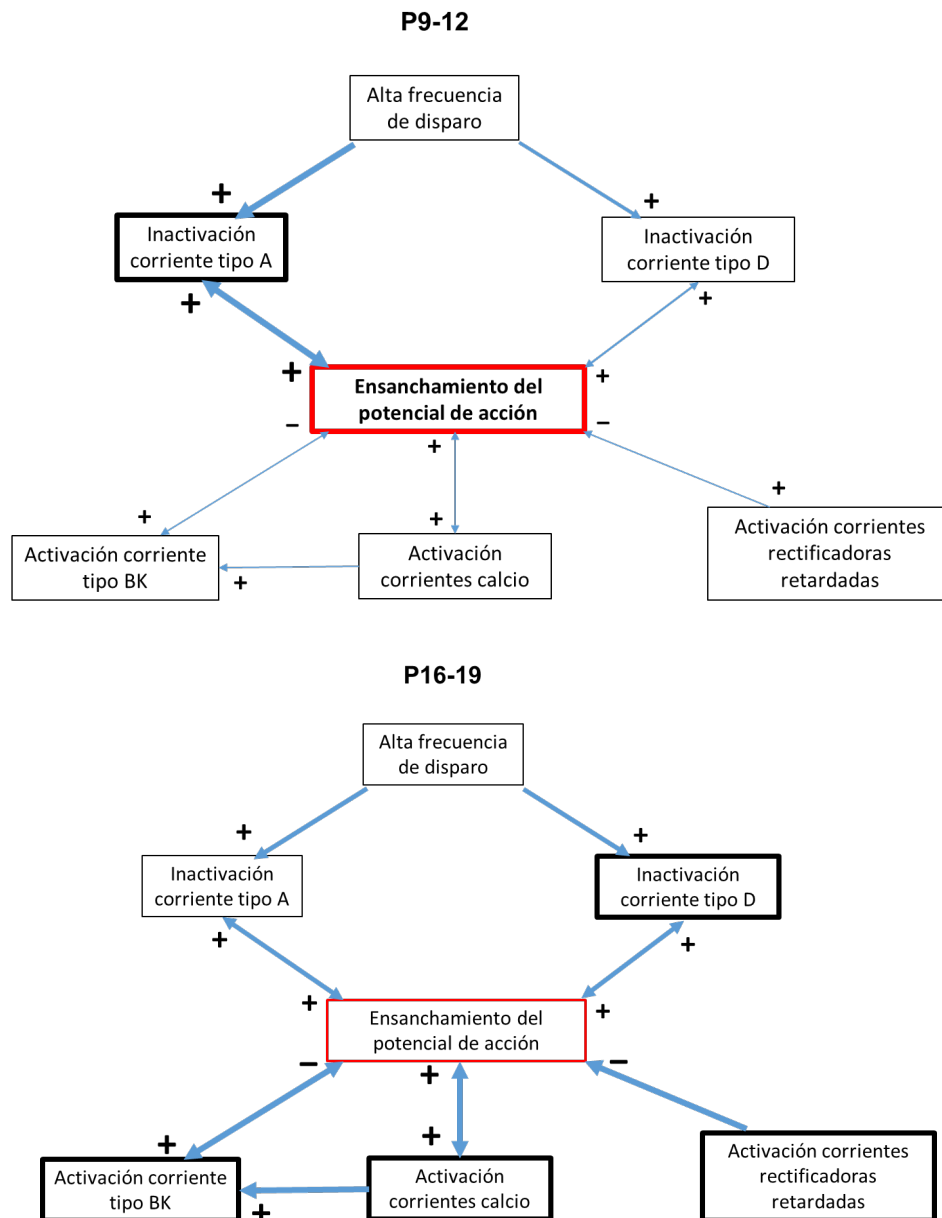


Figura D1: Papel de las principales corrientes que intervienen en el ensanchamiento del PA durante el tétanos.

Modificación del diagrama de flujo de Ma y Koester (1996) donde se muestran las principales corrientes que intervienen en el ensanchamiento del PA durante el tétanos.

En el grupo P9-12 (arriba), la contribución de la corriente tipo A en la repolarización del PA es mayor con respecto del resto de las corrientes de potasio, por lo que su inactivación durante el tétanos producen un ensanchamiento progresivo del mismo.

En el grupo P16-19 (abajo) pierde relevancia la corriente tipo A, y aumenta la participación de las corrientes de potasio tipo D, tipo BK y otras rectificadoras retardadas. El aumento de estas corrientes permite que la repolarización del PA no se vea muy afectada durante el tétanos, disminuyendo el ensanchamiento del PA con respecto al grupo P9-12.

En esta tesis, además del efecto que tiene un tétanos de alta frecuencia sobre la duración del PA, se han observado los efectos del tétanos sobre la amplitud del PA durante el desarrollo. Estas modificaciones parecen relacionadas con los cambios producidos en las fases de despolarización y repolarización (Figura R5):

- Al administrar un tétanos de 10 Hz, la disminución de la velocidad de despolarización es mayor en el grupo P9-12 que en el P16-19, mientras que la disminución de la velocidad de repolarización es similar en ambos intervalos de edad. En estas condiciones, la disminución de la amplitud es mayor en el grupo P9-12 que en el P16-19.
- Al administrar un tétanos de 20 Hz, la disminución de las velocidades de despolarización y repolarización son mayores en el grupo P9-12 que en el P16-19, y la magnitud de estas diferencias es similar para ambos parámetros. En estas condiciones, la disminución de la amplitud es muy similar en ambos grupos de edad.
- Al administrar un tétanos de 50 Hz, la disminución de las velocidades de despolarización y repolarización son mayores en el grupo P9-12 que en el P16-19, pero la magnitud de estas diferencias es mucho mayor en el caso de la velocidad de repolarización que en el de la velocidad de despolarización. En estas condiciones, la disminución de la amplitud es menor en el grupo P9-12 que en el P16-19 (e incluso en el grupo P9-12, las amplitudes de los PAs generados tras el primer estímulo tetánico fueron mayores que la del PA control).

A fin de discutir estos resultados hay que tener en cuenta:

1. En la sección anterior de la Discusión se propuso una contribución de la corriente tipo A de potasio (junto a la corriente transitoria de sodio) en el final de la fase despolarizante, sobre todo en las neuronas del grupo P9-12, cuyos PAs tardan más tiempo en despolarizarse que los del grupo P16-19, y dado que a esa edad presentan más corriente tipo A y menos corriente transitoria de sodio que en el grupo P16-19 (Klee et al. 1995; Costa 1996; Potthoff & Dietzel 1997; Sánchez-Alonso et al. 2012).
2. Madeja demostró en neuronas piramidales de CA1 de ratas adultas que una reducción de hasta un 34 % en la corriente de sodio no modificaba la

morfología del PA, sugiriendo que las neuronas contienen una cantidad de canales de sodio superior a la requerida para la generación de un PA, pero necesaria en un disparo repetitivo (Madeja 2000).

3. La reducción que se produce en la velocidad de despolarización en las neuronas del grupo P9-12 es mayor que en las del grupo P16-19, independientemente de la frecuencia del tétanos, por lo que es posible que la dotación de los canales de sodio de reserva aumente durante el desarrollo. Sin embargo, bien porque la cantidad de los canales de sodio es suficiente, bien porque los canales de sodio tienen una cinética de recuperación de la inactivación muy rápida (Kuo & Bean 1994), se ve mucho menos modificada la velocidad de despolarización que la velocidad de repolarización en el grupo P9-12, con un tétanos de 50 Hz.
4. Trabajos anteriores demostraron que durante un tétanos de 7 Hz (Ma & Koester 1996) o 200 Hz (Gu et al. 2007) no se aprecia una gran disminución de la corriente transitoria de sodio, mientras que la corriente de potasio tipo A disminuía progresiva y drásticamente.

Por tanto, con respecto a los efectos del tétanos sobre la amplitud del PA:

- En las neuronas del grupo P9-12, tras un disparo repetitivo de alta frecuencia (como por ejemplo 50 Hz) se produciría una gran inactivación de la corriente A, en comparación con la inactivación de la corriente transitoria de sodio, que desbalancearía la contribución sodio/potasio del final de la fase de despolarización en favor de la entrada de sodio. Este desequilibrio sodio/potasio incrementaría la amplitud de los PAs con respecto de la del primer PA, en el que actuarían conjuntamente la corriente A y la corriente de sodio en la parte final de la fase despolarizante (Figuras R5C y R6).
- Por el contrario, en el grupo P16-19, el tiempo de despolarización es menor. Además, aumenta la corriente transitoria de sodio, aumentan las corrientes de potasio tipo D, otras corrientes rectificadoras retardadas y la corriente tipo BK (Costa et al. 1994; Klee et al. 1995; Costa 1996; Kang et al. 1996a; Kang, et al. 1996b; Aoki & Baraban 2000; Sánchez-Alonso et al. 2012; Giglio & Storm 2014), y disminuye la corriente tipo A (Klee et al. 1995; Sánchez-Alonso et al. 2012). Todo ello contribuiría a que en la parte final de la fase despolarizante

sea la entrada de sodio el componente principal, y por tanto que la amplitud disminuya con el disparo repetitivo de alta frecuencia (Figura R5C y R6).

1.3. La excitabilidad neuronal cambia durante el desarrollo postnatal.

Se ha sugerido que la maduración postnatal de la excitabilidad intrínseca coincide e interactúa con el desarrollo de programas o procesos que conllevan crecimiento de axones y dendritas, así como el desarrollo de conexiones sinápticas (Moody 1998). Los resultados de la tesis muestran que la evolución de las propiedades pasivas y activas durante el desarrollo provoca cambios opuestos en la excitabilidad neuronal.

En función de las propiedades pasivas, se observa una reducción de la excitabilidad neuronal en respuesta a pulsos de igual intensidad de corriente durante el desarrollo (Figura R8), debido a la disminución en la resistencia de la membrana. El menor tamaño y la mayor resistividad específica de las neuronas más inmaduras atribuyen a estas neuronas un mayor grado de excitabilidad, ya que pequeñas fluctuaciones en la conductancia de la membrana producen un mayor cambio en el potencial de la membrana que en las neuronas del grupo P16-19 (Spigelman et al. 1992; Sánchez-Alonso et al. 2012).

Sin embargo, debido a sus propiedades activas, se observa un incremento de la excitabilidad intrínseca durante el desarrollo en las neuronas registradas. Para justificar este aumento de excitabilidad hay que valorar que las corrientes que intervienen en la generación del PA tienen el siguiente comportamiento durante un disparo repetitivo de alta frecuencia (Ma & Koester 1996; Kim et al. 2005; Gu et al. 2007):

- La corriente transitoria de sodio disminuye ligeramente. La rápida desinactivación de sus canales podría explicar que esta corriente no esté muy disminuida, si bien es cierto que la desinactivación de estos canales es dependiente de voltaje (Kuo & Bean 1994).
- La corriente tipo A de potasio disminuye drásticamente debido a que sus canales tienen una cinética de inactivación rápida (Connor & Stevens 1971a; Connor & Stevens 1971b; Johnston et al. 2000; Kim et al. 2005; Bourdeau et al.

2011; Sánchez-Alonso et al. 2012). Su desinactivación también es dependiente de voltaje (Bähring et al. 2001).

- Aumentan otras corrientes rectificadoras retardadas de potasio, debido a que tienen unas cinéticas de activación y de inactivación lentas (Storm 1988; Johnston et al. 2010; Sánchez-Alonso et al. 2012).
- Aumentan las corrientes de calcio, y como consecuencia aumentan las corrientes de potasio dependientes de calcio.

En el grupo P9-12, la principal corriente de potasio en la repolarización del PA es la corriente tipo A. Su inactivación progresiva por el disparo repetitivo provoca un gran incremento en la duración de los PAs (ver la Sección anterior de Discusión), y una repolarización menos eficaz, que retrasaría la desinactivación de los canales de sodio necesarios para la generación de un nuevo PA (Gu et al. 2007; Gittis et al. 2010) y la desinactivación de los canales implicados en la corriente tipo A, incrementando el aumento de la duración.

En el grupo P16-19, las corrientes que intervienen en la generación del PA tienen el siguiente comportamiento durante un disparo repetitivo de alta frecuencia:

- Aumenta la corriente transitoria de sodio y disminuye la corriente tipo A (Huguenard et al. 1988; Klee et al. 1995; Costa 1996; Potthoff & Dietzel 1997; Sánchez-Alonso et al. 2012), justificando la hiperpolarización del umbral de disparo observada en las neuronas registradas en esta tesis. (Tabla R2, Figura R2). Además un aumento en la expresión de canales de sodio podría facilitar la generación del PA según la hipótesis de Madeja (2000).
- Aumentan otras corrientes rectificadoras retardadas de potasio y la corriente tipo BK (Costa et al. 1994; Klee et al. 1995; Kang et al. 1996a; Kang, et al. 1996b; Aoki & Baraban 2000; Sánchez-Alonso et al. 2012; Giglio & Storm 2014). Pese a que algunos autores han propuesto que la inactivación de los canales de potasio tipo D y tipo BK contribuyen al incremento en la duración de los PAs durante el disparo repetitivo (Shao et al. 1999; Faber & Sah 2003; Kim 2014), la repolarización de los PAs es más eficaz que la observada en el grupo P9-12, favoreciendo la recuperación de la inactivación de los canales de sodio y potasio previamente inactivos (Gu et al. 2007), justificando:

- El desplazamiento hacia la izquierda y el incremento de la pendiente de la curva de entrada-salida frente a pulsos que despolarizan la membrana a un potencial de estabilización similar (Figura R9).
- Un incremento en la frecuencia máxima de disparo (Figura R10).

Estos resultados se pueden relacionar con publicaciones que demuestran la importancia de los canales de potasio tipo BK y los canales Kv2 en la repolarización de los PAs durante un disparo de alta frecuencia y en el incremento de la frecuencia de disparo (Du et al. 2000; Gu et al. 2007; Gittis et al. 2010; Liu & Bean 2014).

1.4. Resumen.

En el período comprendido entre los 9 y los 19 días de edad postnatal se produce un enorme desarrollo de las características morfológicas (Pokorny & Yamamoto 1981a; Pokorny & Yamamoto 1981b; Schwartzkroin & Kunkel 1982; Liao et al. 1999) y de la conectividad sináptica (Hsia et al. 1998; Groc et al. 2003) de las neuronas piramidales de CA1. En esta etapa de desarrollo el animal se vuelve más activo y con un mayor comportamiento exploratorio que depende de la actividad del hipocampo (Langston et al. 2010). Este incremento en la actividad del circuito provoca cambios compensatorios en las propiedades electrofisiológicas de las neuronas piramidales de CA1 durante el desarrollo para mantener un control de su excitabilidad:

- Disminuye la excitabilidad intrínseca en función de sus propiedades pasivas: el aumento de superficie y la disminución de resistividad específica durante el desarrollo (McCormick & Prince 1987; Spigelman et al. 1992) disminuye la resistencia de la membrana, lo que permite que estímulos de una misma intensidad produzcan menores cambios en el potencial de la membrana.
- Disminuye la excitabilidad intrínseca en función de sus propiedades activas: el incremento de corrientes activas en reposo, como las tipo H, tipo M o las corrientes independientes de voltaje de fuga (Lüthi & McCormick 1998; Patel & Honoré 2001; Lamas et al. 2002; Peters et al. 2005; Shah et al. 2008; Brown & Passmore 2009; Lewis et al. 2010) hiperpolarizan el potencial de la membrana en reposo.

- Aumenta la excitabilidad intrínseca en función de sus propiedades activas: durante el desarrollo se hiperpolariza el umbral de disparo y aumenta la amplitud de los PAs debido a que se produce un incremento de la corriente transitoria de sodio (Costa 1996; Potthoff & Dietzel 1997) y una disminución de la corriente de potasio tipo A (Klee et al. 1995; Sánchez-Alonso et al. 2012). Además, el incremento de corrientes de potasio de inactivación lenta como las tipo D, tipo BK y otras corrientes rectificadoras retardadas durante el desarrollo (Costa et al. 1994; Klee et al. 1995; Aoki & Baraban 2000; Sánchez-Alonso et al. 2012; Giglio & Storm 2014) permiten una repolarización del PA más eficaz frente a estimulaciones prolongadas o de alta frecuencia, pudiendo alcanzar una mayor frecuencia de disparo máxima.

Estos cambios en la excitabilidad neuronal permiten que ante la mayor actividad que tiene el hipocampo con el avance del desarrollo, las neuronas piramidales de CA1 procesen los estímulos de un modo más eficiente.

2. Una nueva plasticidad de la excitabilidad intrínseca a corto plazo en las neuronas piramidales de CA1 del hipocampo.

2.1. El potencial de la membrana afecta a las propiedades pasivas de la membrana neuronal.

Las propiedades pasivas de la neurona dependen del potencial de la membrana en el que se encuentre en cada momento debido a que dicho potencial modifica las diferentes conductancias, y en definitiva influye en su comportamiento eléctrico subumbral (Connors et al. 1982). Las neuronas registradas en la tesis presentan un incremento de la resistencia y de la constante de tiempo de la membrana tras despolarizar sostenidamente la membrana a potenciales subumbrales en ambos grupos de edad (P9-12 y P16-19) (Tabla R6, Figura R11), resultados similares a los descritos por otros autores (Connors et al. 1982; Biscoe & Duchon 1985; McCormick et al. 1985). Un aumento en la resistividad específica de las neuronas registradas al despolarizar la membrana a potenciales subumbrales explicaría el aumento de la resistencia y la constante de tiempo de la membrana, debido al cierre de canales dependientes de voltaje. Este cambio de las propiedades pasivas podría deberse al cierre de los canales HCN implicados en la corriente tipo H, una corriente catiónica despolarizante que aumenta con la hiperpolarización (Lüthi & McCormick 1998; Peters et al. 2005; Lewis et al. 2010). Siguiendo esta hipótesis, la Figura D2 muestra un registro obtenido tras fijar el potencial de la membrana a -80 mV, antes y después de aplicar extracelularmente el bloqueante de la corriente H, cesio (3 mM). Tras administrar el cesio se incrementa la resistencia y la constante de tiempo de la membrana a valores similares que los obtenidos en los experimentos en los que se despolarizó el potencial de la membrana.

La capacidad de la membrana no se modifica por el potencial de la membrana en ninguno de los grupos de edad. Dado que la capacidad de la membrana está directamente relacionada con la superficie neuronal (Hille 2001), este resultado indica que el tamaño neuronal no se modificó por la despolarización subumbral sostenida.

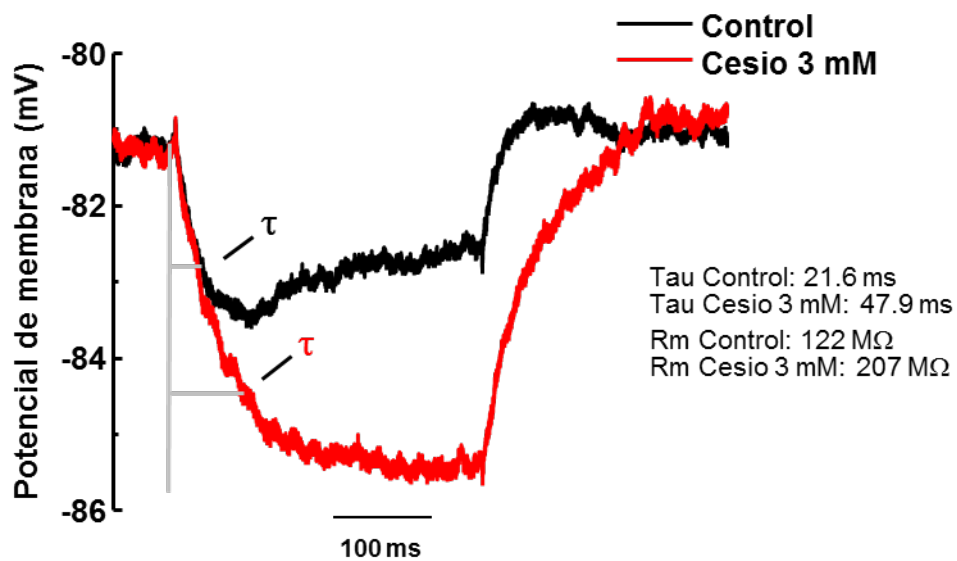


Figura D2: El bloqueo de la corriente tipo H produce un incremento de la resistencia y de la constante de tiempo de la membrana.

Ejemplo representativo del registro obtenido tras administrar un pulso de corriente hiperpolarizante de -20 pA durante 300 ms antes (negro) y después de aplicar a la solución extracelular el bloqueante de la corriente tipo H, cesio (3 mM) (rojo) tras fijar el potencial de la membrana a -80 mV. Al añadir cesio se produce un incremento de la resistencia y de la constante de tiempo de la membrana similar a los observados cuando se fija a -60 mV, por lo que el incremento de estos parámetros al despolarizar la membrana puede ser debido a un cierre de los canales HCN.

2.2. La despolarización sostenida genera una plasticidad a corto plazo en el potencial de acción de las neuronas piramidales de CA1 del grupo P16-19.

La visión clásica sobre cómo afecta la despolarización del potencial de la membrana a los canales dependientes de voltaje que se activan a potenciales subumbrales plantea que éstos sufren una inactivación dependiente del potencial de la membrana y del tiempo (Spigelman et al. 1992; Kuo & Bean 1994; Bossu et al. 1996; Colbert et al. 1997; Mitterdorfer & Bean 2002; Carter et al. 2012; Sánchez-Alonso et al. 2012). Puesto que la inactivación de dichos canales afecta a la morfología de los PAs, en la tesis se estudió el efecto de la despolarización del potencial de la membrana sobre la morfología de los mismos. Para ello se comparó la morfología de los PAs generados a una intensidad umbral con tres protocolos diferentes (Figuras R13 y R15):

- 1) **Protocolo control.** Un pulso de 5 ms de duración, tras fijar el potencial de la membrana a -80 mV. Este protocolo se toma como control puesto que el cambio del potencial de la membrana es rápido, por lo que el porcentaje de canales inactivados es bajo.
- 2) **Protocolo de rampa de 1 s.** Una rampa despolarizante de 1 s de duración, tras fijar el potencial de la membrana a -80 mV. El cambio de voltaje es lento y progresivo en este protocolo, por lo que se espera que el porcentaje de canales inactivados durante la rampa sea mayor que en el protocolo control.
- 3) **Protocolo de despolarización sostenida.** Un pulso de 5 ms de duración tras despolarizar el potencial de la membrana a -60 mV durante al menos 5 minutos. Con este protocolo se esperaría una inactivación dependiente de voltaje mayor que en el protocolo control, pero algo menor que en el protocolo de rampa de 1 s, pues el potencial de fijación previo al pulso de 5 ms es más hiperpolarizado que el potencial al que progresivamente se despolariza la membrana con el protocolo de rampa (Figura D3).

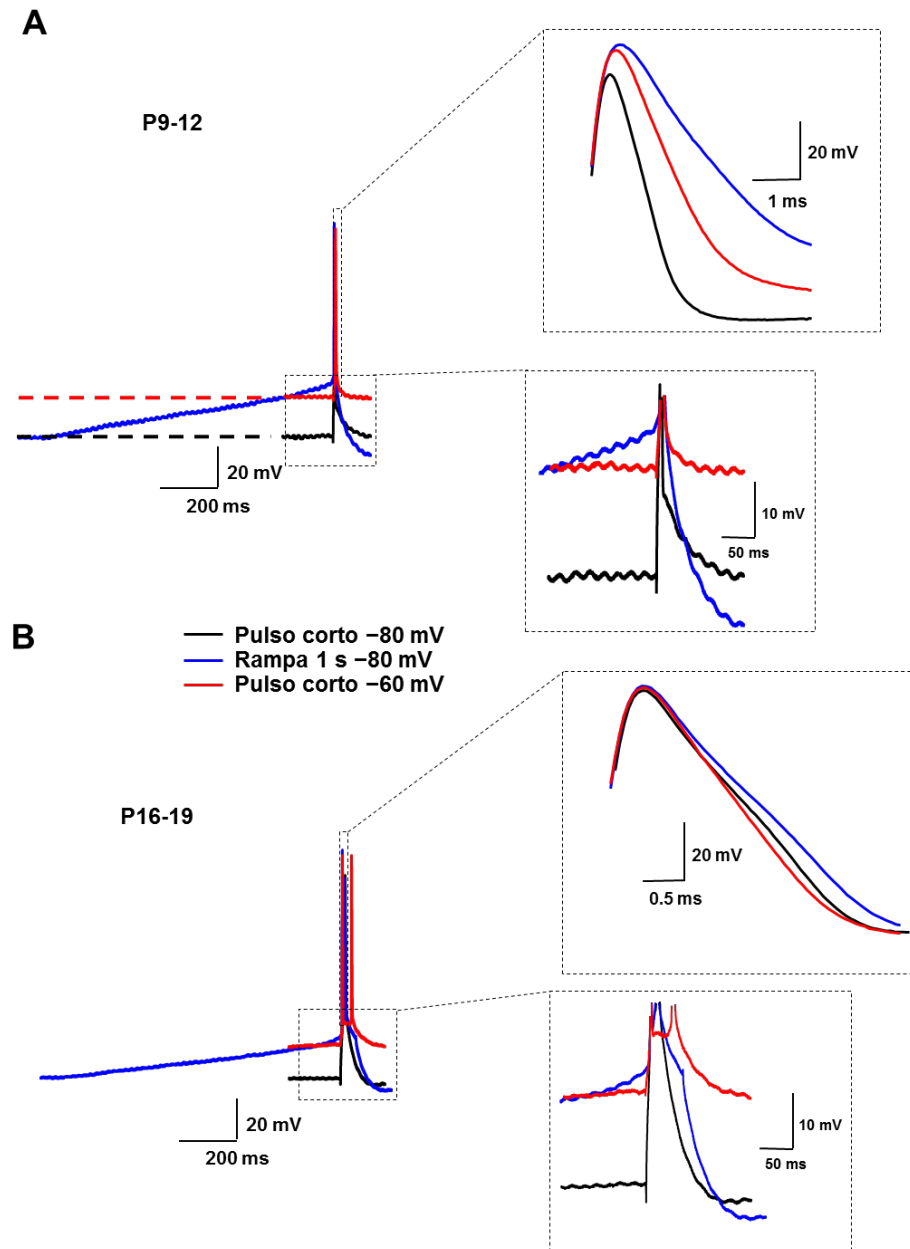


Figura D3: Efecto de la despolarización del potencial de la membrana sobre la morfología de los potenciales de acción.

Registros representativos del PA generado por las neuronas de los grupos P9-12 (A) y P16-19 (B) con los siguientes protocolos:

1. Un pulso de 5 ms a potencial de la membrana de -80 mV (negro).
2. Una rampa de 1 s a potencial de la membrana de -80 mV (azul).
3. Un pulso de 5 ms tras fijar la membrana a -60 mV durante 5 min (rojo).

La despolarización requerida para alcanzar el umbral de disparo alcanza voltajes por encima de -60 mV, durante períodos de tiempo superiores en el protocolo 2 que en el 3 en ambos grupos de edad. Pero dichas diferencias son especialmente grandes en el grupo P9-12 debido a que el umbral de disparo está más hiperpolarizado. Todo esto provoca una inactivación de la corriente tipo A mayor, y por tanto una mayor duración del PA inducido por el protocolo 2 con respecto del generado con el protocolo 1. Sin embargo, no explica que en el grupo P16-19, el PA generado con el protocolo 3 sea de menor duración que el generado con el protocolo 1.

En las neuronas del grupo P9-12:

- El PA generado tras una rampa de 1 s y tras una despolarización sostenida tiene una mayor duración media y menor velocidad de repolarización que el PA generado con el protocolo control (Tabla R7-R8, Figuras R13-R17). Diversos autores han descrito un aumento en la duración del PA al despolarizar el potencial de la membrana, producido por una disminución de la velocidad de repolarización (Spigelman et al. 1992; Bossu et al. 1996; Shu et al. 2006; Shu et al. 2007a; Gong et al. 2008; Sánchez-Alonso et al. 2012). Este aumento se produce fundamentalmente por una inactivación de la corriente de potasio tipo A (Ma & Koester 1996; Kim et al. 2005; Gu et al. 2007).
- El PA generado con los protocolos de rampa de 1 s y de despolarización sostenida produce un incremento de la amplitud (Tabla R7-R8, Figuras R13-R17) similar al incremento observado tras administrar un tétanos de 50 Hz (Tabla R5, Figuras R5-R6). Según lo discutido previamente (Secciones 1.2 y 1.3 de Discusión), la amplitud del PA generado en el grupo P9-12 con el protocolo control está determinada por las corrientes transitoria de sodio y de potasio tipo A. En los protocolos de rampa despolarizante y de despolarización sostenida se inactiva la corriente tipo A en gran medida, mientras que la inactivación de la corriente de sodio podría ser pequeña, ya que en diversos estudios sobre su cinética de activación se demuestra que la corriente aparece en torno a los -50 mV y ésta no es el 50 % de la máxima hasta alcanzar un potencial de la membrana comprendido entre los -35 mV y los -25 mV (Costa 1996; Martina & Jonas 1997; Raman & Bean 1997; Baranauskas & Martina 2006). Por lo tanto, el incremento de la amplitud del PA generado por los protocolos de rampa despolarizante y despolarización sostenida está determinado fundamentalmente por la corriente de sodio, sin la oposición de la corriente de potasio tipo A. Un resultado similar se ha observado en otros trabajos (Spigelman et al. 1992; Sánchez-Alonso et al. 2012).
- El PA generado con los protocolos de rampa de 1 s y de despolarización sostenida no presenta grandes cambios en el umbral de disparo y en la velocidad de despolarización, con respecto del generado con el protocolo control (el umbral no cambia con el protocolo de rampa de 1 s, y se despolariza 1 mV con la despolarización sostenida; la velocidad de despolarización disminuye 3,1 mV/ms con el protocolo de rampa de 1 s, y 7,8 mV/ms con la despolarización sostenida,

Tabla R7-R8, Figuras R13-R16). La corriente transitoria de sodio aparece a partir de potenciales de la membrana próximos o más despolarizados que el umbral de disparo de PAs (Costa 1996; Martina & Jonas 1997; Raman & Bean 1997; Baranauskas & Martina 2006). No obstante, Carter y colaboradores describieron un componente de la corriente transitoria de sodio (de pequeña amplitud) que se activaba a partir de potenciales subumbrales en torno a los -75 mV (Carter et al. 2012), por lo que la inactivación de este componente podría explicar las pequeñas diferencias que se observan en el PA generado con el protocolo de despolarización sostenida, con respecto del generado con el protocolo control.

Hay que destacar que el protocolo de rampa de 1 s despolariza progresivamente el potencial de la membrana a valores más despolarizados que -60 mV (Figura D3), provocando una mayor inactivación dependiente de voltaje de la corriente tipo A, ya que en potenciales entre los -60 mV y los -50 mV, su curva de inactivación se encuentra en la fase lineal (Ficker & Heinemann 1992; Holmqvist et al. 2002; Kim et al. 2005; Anderson et al. 2010 a; Sánchez-Alonso et al. 2012). Como consecuencia, la magnitud de los cambios producidos en la duración media, velocidad de repolarización y amplitud del PA generado con el protocolo de rampa de 1 s fue mayor que tras despolarizar sostenidamente la membrana. Además, la mayor inactivación de corriente tipo A con el protocolo de rampa de 1 s podría compensar la despolarización del umbral de disparo y la disminución de la velocidad de despolarización esperadas por una inactivación subumbral de los canales de sodio, explicando que estos parámetros no varíen en el PA generado por la rampa de 1 s, con respecto del PA generado con el protocolo control.

En las neuronas del grupo P16-19, el PA generado con el protocolo de rampa de 1 s:

- Aumenta la duración media y disminuye la velocidad de repolarización, con respecto del generado mediante el protocolo control (Tabla R7, Figuras R13-R14), aunque la magnitud del aumento de la duración del PA es menor que la producida en el grupo P9-12, debido a que en las neuronas del grupo P16-19 disminuye la contribución de la corriente tipo A y aumenta la contribución de otras corrientes de potasio con inactivación lenta en la repolarización del PA, como las corrientes tipo D, otras corriente rectificadoras retardadas de potasio y la corriente tipo BK (Costa et al. 1994; Klee et al. 1995; Aoki & Baraban 2000; Sánchez-Alonso et al. 2012; Giglio & Storm 2014).

- Provoca que la amplitud del PA generado sea similar al generado mediante el protocolo control, debido al aumento de estas corrientes de potasio (tipo D, tipo BK y otras corrientes rectificadoras retardadas), junto a la disminución de la corriente tipo A y al incremento de la corriente transitoria de sodio (Costa 1996; Potthoff & Dietzel 1997) (Tabla R7, Figuras R13-R14). Además, se observó una pequeña despolarización del umbral de disparo y una ligera disminución de la velocidad de despolarización, consistentes con la inactivación de la corriente transitoria de sodio activada a potenciales de la membrana subumbrales (Carter et al. 2012).

El PA generado con el protocolo de despolarización sostenida se esperaría que provocara cambios en la morfología del PA similares a los producidos con la rampa de 1 s, quizá de menor magnitud debido a que el protocolo de rampa de 1 s despolariza progresivamente la membrana a potenciales subumbrales más despolarizados que el protocolo de despolarización sostenida (Figura D3). Sin embargo, en las neuronas del grupo P16-19 tras despolarizar sostenidamente la membrana a -60 mV (Tabla R8, Figuras R15-R17):

- El PA no sólo no presenta una mayor duración media que el generado en situación control, sino que disminuye ligeramente la duración, debido a un incremento de su velocidad de repolarización.
- El PA tiene una despolarización del umbral de disparo y una disminución de la velocidad de despolarización de mayor magnitud que en el grupo P9-12 (el umbral se despolariza 1,1 mV en el grupo P9-12, 2,6 mV en el grupo P16-19; la velocidad de despolarización disminuye 7,8 mV/ms en el grupo P9-12, y 13,7 mV/ms en el grupo P16-19). Estos resultados podrían no explicarse únicamente por la inactivación subumbral de los canales de sodio descrita por Carter y colaboradores (2012).
- El PA disminuye ligeramente su amplitud.

En las neuronas del grupo P30-50, el cambio de los parámetros del PA generado tras despolarizar sostenidamente la membrana fue similar al descrito en P16-19 (Tabla R8, Figuras R15-R17).

Estos resultados reflejan la expresión de una forma de plasticidad intrínseca a corto plazo en respuesta a una despolarización subumbral sostenida de la membrana plasmática. La disminución en la duración del PA, el incremento en la velocidad de repolarización, la despolarización del umbral de disparo y la disminución de la amplitud sugieren un incremento de

corrientes repolarizantes activadas a potenciales subumbrales, siendo la corriente de potasio tipo A la principal candidata, ya que tiene una activación rápida a potenciales subumbrales, e interviene en la repolarización del PA y en el control del umbral de disparo (Connor & Stevens 1971b; Klee et al. 1995; Mitterdorfer & Bean 2002; Johnston et al. 2010; Sánchez-Alonso et al. 2012). De acuerdo con esta hipótesis, Kim y colaboradores mostraron una disminución de la duración del PA y una hiperpolarización de su umbral de disparo en las neuronas que sobreexpresaban el canal Kv4.2 (Kim et al. 2005). No obstante, también podrían estar implicadas otras corrientes de potasio, como la corriente tipo D. Esta corriente de potasio interviene en la repolarización del PA (Storm 1988; Mitterdorfer & Bean 2002; Saviane et al. 2003; Shu, 2007b; Kirchheim et al. 2013), se activa a potenciales de la membrana subumbrales con una cinética rápida (Storm 1988; Wu & Barish 1992; Crépel et al. 1993), y se le ha asociado un papel importante en la despolarización del umbral de disparo y en el retraso de la generación del PA debido a su activación subumbral y a su cinética de inactivación lenta (Storm 1988; Bekkers & Delaney 2001; Saviane et al. 2003; Sánchez-Alonso et al. 2012; Giglio & Storm 2014). También podría contribuir en la expresión de la plasticidad un aumento de la corriente de potasio dependiente de calcio tipo BK. Se ha descrito que el canal KCav1.1 (canal BK) puede formar complejos con el canal Cav3, implicado en la corriente tipo T de calcio (Engbers et al. 2012; Engbers et al. 2013; Rehak et al. 2013), y los canales Cav3 se activan a potenciales de la membrana próximos al potencial de reposo (Bean & McDonough 1998; Perez-reyes 2003). Sin embargo, esta hipótesis parece menos probable ya que los canales implicados en la corriente tipo BK también son dependientes de voltaje, y a -60 mV se requiere una concentración elevada de calcio para que los canales se abran (Hille 2001). Engbers y colaboradores mostraron que la conductancia del canal KCav1.1 en los complejos KCav1.1-Cav3 es casi nula a -60 mV (Engbers et al. 2013). Por tanto, una plasticidad que afecte a la expresión o conductancia de los canales implicados en las corrientes tipo A y/o tipo D de potasio explicaría los resultados obtenidos por el protocolo de despolarización sostenida. No obstante, la pequeña disminución de la amplitud del PA observada al despolarizar sostenidamente la membrana en los grupos P16-19 y P30-50, podría explicarse también por la inactivación subumbral de los canales de sodio descrita por Carter y colaboradores (2012).

Por último, hay que destacar que la magnitud de la disminución en la duración del PA producido por la plasticidad es de mayor magnitud que el que se ha mostrado en los resultados de la tesis debido a que:

1. El PA inducido mediante el protocolo de despolarización sostenida se genera en la parte final del pulso de 5 ms, y que la repolarización pasiva del potencial de la membrana se suma a la repolarización activa propia del PA.
2. El cambio de voltaje necesario para disparar un PA es menor con el potencial de la membrana fijado a -60 mV que a -80 mV, y a que su constante de tiempo de la membrana es mayor. Por tanto, el componente pasivo de la repolarización del pulso afecta menos al PA generado tras despolarizar sostenidamente la membrana a -60 mV que en el obtenido en situación control en el que se fijó el potencial de la membrana a -80 mV (Figura D4).

Como consecuencia, al sustraer un registro en el que sólo hay respuesta subumbral pasiva del que presenta respuesta supraumbral (Spigelman et al. 1992), se aprecia que la magnitud de la disminución en la duración del PA producido por la plasticidad es de mayor magnitud que el que se ha mostrado en los resultados de la tesis (Figura D4).

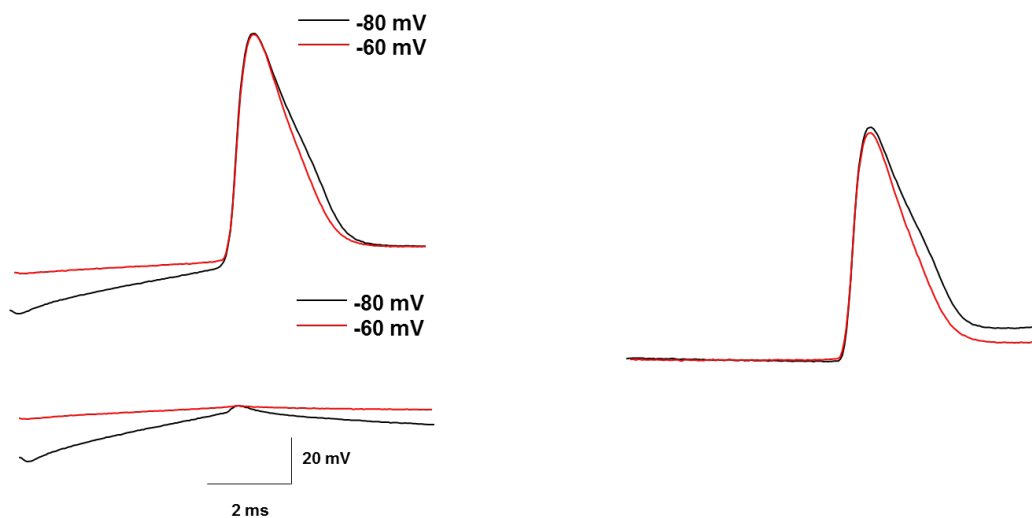


Figura D4: El componente pasivo de la repolarización enmascara el efecto real de la plasticidad.

Registros representativos de neuronas del grupo P16-19 tras fijar el potencial de la membrana a -80 mV (negro) y a -60 mV (rojo).

A la izquierda se muestran cuatro registros: dos tras aplicar el pulso que genera un PA (arriba), cuya repolarización tiene un componente activo y otro pasivo, y otros dos cuando no se genera un PA (abajo), cuya repolarización es fundamentalmente pasiva.

A la derecha se muestra la sustracción de los registros que generan PAs de los que no lo inducen, por lo que en ellos la fase repolarizante es únicamente debida a las corrientes activas. La repolarización del PA producido al despolarizar sostenidamente el potencial de la membrana es más rápida que la registrada sin sustracción al eliminar el componente pasivo.

La plasticidad observada en las neuronas piramidales de CA1 registradas en esta tesis se induce con despolarizaciones de 15 segundos, y se hace máxima en torno a despolarizaciones de 5 minutos (Figura R22). El proceso de extinción de la plasticidad tiene un perfil temporal similar (Figura R25). No obstante, dado que el estudio temporal de la plasticidad está limitado por un control cuya duración de la despolarización es de 1 segundo, y la siguiente duración empleada fue de 15 segundos, no se puede descartar que el tiempo mínimo necesario para iniciar los procesos de inducción y de extinción de la plasticidad sea menor. Los perfiles temporales observados, junto a su inducción a potenciales de la membrana subumbrales, contrastan con la mayoría de las plasticidades intrínsecas descritas, las cuales requieren de períodos de inducción mucho más largos (Franklin et al. 1992; Moulder et al. 2003; Grubb & Burrone 2010; O'Leary et al. 2010; Tong et al. 2010) y/o despolarizaciones supraumbrales mucho mayores (Fan et al. 2005; Campanac & Debanne 2008; Wu et al. 2008; Brown & Randall 2009; Jung & Hoffman 2009).

2.3. La plasticidad a corto plazo expresada en las neuronas piramidales de CA1 del grupo P16-19 afecta a su excitabilidad intrínseca.

Las neuronas pueden cambiar sus propiedades de entrada-salida en función de la actividad previa. Dichos cambios pueden ser debidos a modificaciones en la conexión entre dos neuronas (plasticidad sináptica) o a cambios en la probabilidad de disparo en respuesta a despolarizaciones como las producidas por potenciales excitadores post-sinápticos (plasticidad intrínseca) (Beck & Yaari 2008). Durante la última década, diversos estudios han demostrado que en respuesta a un aumento de la actividad neuronal, se produce un incremento en corrientes de potasio y/o una disminución en corrientes de calcio (Franklin et al. 1992; Moulder et al. 2003; Fan et al. 2005; Campanac & Debanne 2008; Brown & Randall 2009; Jung & Hoffman 2009; O'Leary et al. 2010; Tong et al. 2010; Steinert et al. 2011). La excitabilidad de una neurona depende entre otros factores del potencial de la membrana en reposo y del umbral de disparo. La diferencia entre estos dos potenciales de la membrana tiene un papel crucial que gobierna la transmisión de actividad entre dos neuronas sinápticamente conectadas (Fricker et al. 1999). El protocolo de despolarización sostenida aproxima el potencial de la membrana al umbral de disparo, por lo que deja a la neurona en un estado más excitable. Los experimentos de excitabilidad descritos en esta tesis se realizaron tomando como referencia el umbral de

corriente (Figura R26) o el potencial de estabilización teórico (Figura R27), con el objetivo de eliminar este factor, neutralizando las diferencias entre el potencial de fijación y el umbral de disparo. En estas condiciones se observan cambios en la excitabilidad intrínseca tras despolarizar sostenidamente el potencial de la membrana, los cuales varían en función de sus propiedades activas y de sus propiedades pasivas.

En función de sus propiedades pasivas, el protocolo de despolarización sostenida provoca un desplazamiento hacia la izquierda de la curva de entrada-salida frente a pulsos de igual intensidad de corriente supraumbral, tanto en P9-12 como en P16-19 (Figura R26) debido a un aumento de la resistencia de la membrana. El cierre de los canales HCN al despolarizar sostenidamente el potencial de la membrana (McCormick & Pape 1990; Lüthi & McCormick 1998; Vasilyev & Barish 2002; Lewis et al. 2010) produce un aumento de la resistividad específica de las neuronas, con respecto de la observada tras fijar el potencial de la membrana a -80 mV, incrementando el grado de excitabilidad, ya que pequeñas fluctuaciones en la conductancia de la membrana producen un mayor cambio en su potencial de la membrana (Spigelman et al. 1992; Sánchez-Alonso et al. 2012).

Debido a sus propiedades activas, el protocolo de despolarización sostenida provoca un comportamiento diferente en los grupos P9-12 (donde la plasticidad aún no se ha desarrollado) y P16-19 (donde se expresa la plasticidad intrínseca). Esto se refleja en el grupo P9-12, cuya curva de entrada-salida frente al potencial de estabilización teórico es similar independientemente del potencial de fijación (Figura R27). Sin embargo, en el grupo P16-19 disminuye la excitabilidad neuronal frente a un potencial de estabilización teórico similar tras despolarizar sostenidamente la membrana (Figura R27), puesto que disminuye la excitabilidad intrínseca en el grupo P16-19 y no se modifica en el grupo P9-12.

A fin de discutir las corrientes implicadas en la plasticidad intrínseca que presenta el grupo P16-19, se consideran inicialmente dos corrientes: la corriente de potasio tipo M y la corriente catiónica tipo H. La corriente de potasio tipo M tiene una gran importancia para el control de la frecuencia de disparo (Brown & Adams 1980; Peters et al. 2005; Brown & Randall 2009), y la corriente catiónica tipo H regula la respuesta de la neurona ante una hiperpolarización (McCormick & Pape 1990; Lüthi & McCormick 1998; Vasilyev & Barish 2002; Lewis et al. 2010). El comportamiento de estas corrientes en los potenciales de fijación estudiados es el siguiente:

- En situación control (-80 mV), los canales KCNQ se encuentran cerrados, y su apertura durante el pulso despolarizante produce una acomodación que disminuye la frecuencia de disparo. Sin embargo, hay un porcentaje de canales

HCN abiertos, y su cierre durante el pulso atenúa la acomodación producida por la corriente tipo M.

- Tras el protocolo de despolarización sostenida, un porcentaje de los canales KCNQ están abiertos, por lo que la capacidad de acomodación de la corriente tipo M durante el pulso despolarizante es menor que en la situación control. Por el contrario, no hay oposición de la corriente tipo H, pues la mayor parte de los canales HCN están cerrados a -60 mV.

En consecuencia, el comportamiento opuesto que tienen estas corrientes permite que la respuesta a despolarizaciones de igual magnitud no se vea afectada por el potencial de fijación. Además de la contribución de las corrientes tipo H y tipo M, la corriente de potasio tipo A interviene en la modulación de la frecuencia de disparo, junto a su papel en la repolarización del PA (Connor & Stevens 1971a; Connor & Stevens 1971b; Johnston et al. 2000; Kim et al. 2005; Bourdeau et al. 2011; Sánchez-Alonso et al. 2012). Kim y colaboradores demostraron una disminución de la frecuencia de disparo de neuronas piramidales de CA1 que sobreexpresaban el canal Kv4.2 (Kim et al. 2005). Por tanto, un incremento de corriente tipo A al despolarizar sostenidamente el potencial de la membrana podría disminuir la frecuencia de disparo en respuesta a despolarizaciones de igual magnitud. Diversos autores también han observado que aumenta la frecuencia de disparo tras bloquear la corriente de potasio tipo D (Bekkers & Delaney 2001; Saviane et al. 2003; Cudmore et al. 2010; Kirchheim et al. 2013), por lo que un posible incremento de la corriente tipo D podría contribuir a disminuir la frecuencia de disparo frente a una despolarización de igual magnitud.

Por otra parte, en respuesta a un tren de pulsos de 5 ms con una frecuencia de 10 Hz no actúan las corrientes tipo H y tipo M durante cada pulso debido a que su activación es más lenta (Brown & Adams 1980; McCormick & Pape 1990). De este modo se puede evaluar de una forma más controlada el efecto de la plasticidad a corto plazo sobre la excitabilidad intrínseca. En las neuronas registradas en esta tesis, un tétanos de 10 Hz con una intensidad de corriente 1,1 supraumbral induce la generación de PAs en algunos pulsos (éxitos) y en otros no (fracasos). Un resultado similar fue descrito previamente por Muñoz-Cuevas y colaboradores (2004), quienes demostraron que con un tétanos de 10 Hz disminuye progresivamente el factor de seguridad para el disparo de un PA (definido como la diferencia entre la despolarización máxima del estímulo y el umbral de disparo) debido a una despolarización de su umbral de disparo. En las neuronas registradas del grupo P9-12, el número de éxitos es mayor tras despolarizar sostenidamente la membrana a -60 mV que en la situación control. Esto puede ser debido a que al despolarizar la membrana se inactiva gran parte de la corriente tipo A (Spigelman et al. 1992; Bossu et al. 1996;

Mitterdorfer & Bean 2002), que en la situación control se opone a la corriente transitoria de sodio y contribuye a despolarizar el umbral de disparo durante el tétanos (Hoffman et al. 1997; Kim et al. 2005). Sin embargo, en las neuronas del grupo P16-19, el número de éxitos fue menor tras el protocolo de despolarización sostenida que en condiciones controles. Un incremento de la corriente tipo A tras despolarizar sostenidamente la membrana podría despolarizar el umbral de disparo durante el tétanos, disminuyendo el factor de seguridad para el disparo de un PA. También podrían contribuir otras corrientes en la disminución del factor de seguridad al despolarizar sostenidamente el potencial de la membrana, como un posible incremento de la corriente de potasio tipo D. Así, Giglio y Storm demostraron que al bloquear la corriente tipo D con dendrotoxina α aumentaba el número de pulsos capaces de disparar un PA (Giglio & Storm 2014).

Por último, tras aplicar el protocolo de despolarización sostenida se observa una despolarización del umbral de disparo mayor en el grupo P16-19 que en el P9-12, consistente con un incremento de corrientes de potasio como las corrientes tipo A o tipo D (Hoffman et al. 1997; Bekkers & Delaney 2001; Saviane et al. 2003; Kim et al. 2005; Giglio & Storm 2014). En los experimentos de excitabilidad realizados en la tesis se eliminó dicho factor, pero la despolarización del umbral de disparo producida por la plasticidad contribuye a disminuir la excitabilidad intrínseca de la neurona.

Por lo tanto, los resultados sugieren que la plasticidad intrínseca descrita durante esta tesis es una plasticidad homeostática que se encarga de reducir la excitabilidad intrínseca para contrarrestar el aumento de la excitabilidad producido por el protocolo de despolarización sostenida.

2.4. La corriente de potasio tipo A tiene un papel importante en la expresión de la plasticidad intrínseca a corto plazo.

En las neuronas registradas durante esta tesis se ha identificado una nueva forma de plasticidad intrínseca a corto plazo en las neuronas piramidales de CA1. Dicha plasticidad se caracteriza por ser homeostática y reducir la excitabilidad neuronal tras una despolarización subumbral sostenida del potencial de la membrana. Los cambios producidos por la plasticidad en la morfología del PA y en la capacidad de disparo de los PAs sugieren un incremento de las corrientes repolarizantes de potasio. En los últimos años se han publicado otras formas de plasticidad intrínseca que disminuyen la excitabilidad neuronal en respuesta a un aumento de la

actividad. Dichas plasticidades incrementan corrientes de potasio mediadas por los canales Kv2 (Steinert et al. 2011), Kv3 (Tong et al. 2010), KCNQ (Wu et al. 2008; Brown & Randall 2009) y de fuga (O'Leary et al. 2010).

Teniendo en cuenta los efectos de la plasticidad intrínseca descritos en la tesis sobre la excitabilidad neuronal, se consideró que la corriente de potasio tipo A podría tener un papel importante en la generación de esta plasticidad debido a que es una corriente transitoria dependiente de voltaje, cuyas cinéticas de activación e inactivación son rápidas (Connor & Stevens 1971b; Hille 2001; Johnston et al. 2010), activada a potenciales de la membrana subumbrales (Klee et al. 1995; Mitterdorfer & Bean 2002; Bean 2007), que contribuye a la repolarización de los PAs y que modula la frecuencia de disparo (Connor & Stevens 1971a; Connor & Stevens 1971b; Storm 1987; Johnston et al. 2000; Kim et al. 2005; Bourdeau et al. 2011). Según su curva de inactivación, la corriente tipo A generada tras fijar el potencial de la membrana a -60 mV debería ser menor que la generada a -80 mV (Ficker & Heinemann 1992; Holmqvist et al. 2002; Kim et al. 2005; Anderson et al. 2010a; Sánchez-Alonso et al. 2012). Sin embargo, los registros de fijación de voltaje realizados en esta tesis muestran un incremento de la corriente tipo A y una disminución de la constante de tiempo de inactivación tras despolarizar sostenidamente la membrana a -60 mV, en comparación con la registrada a -80 mV (Figura R34). Estos resultados sugieren que el aumento de la corriente tipo A estaría relacionado con una disminución de la cinética de inactivación.

Por último, se observa un bloqueo de la plasticidad al administrar el bloqueante de la corriente tipo A (4AP) a la solución extracelular (Figuras R31-R32). Por tanto, se demuestra que la plasticidad intrínseca se produce, al menos en parte, por un incremento de la corriente tipo A. No obstante, estos resultados descritos no descartan que la plasticidad intrínseca pudiera deberse también a un aumento de la corriente de potasio tipo D, pues la concentración de 4AP empleada también bloquea esta corriente (Storm 1988; Mitterdorfer & Bean 2002; Cudmore et al. 2010; Sánchez-Alonso et al. 2012).

2.5. El calcio que ingresa por los canales tipo T induce la plasticidad intrínseca a corto plazo.

El calcio está implicado en la inducción de casi todas las formas de plasticidad sinápticas e intrínsecas, a corto y largo plazo (Katz & Miledi 1968; Lynch et al. 1983; Malenka et al. 1988; Dudek & Bear 1992; Aizenman & Linden 2000; Zucker & Regehr 2002; Fan et al. 2005; Grubb & Burrone 2010; O'Leary et al. 2010). Además, se ha observado que despolarizaciones sostenidas durante varios días reducen la excitabilidad intrínseca dependiente de calcio en cultivos primarios de hipocampo (O'Leary et al. 2010) y en neuronas del núcleo medial del cuerpo trapezoide (Tong et al. 2010).

Varios aspectos sugieren que la inducción de la plasticidad intrínseca descrita en esta tesis requiere la entrada de calcio por los canales Cav3:

- El bloqueo de la plasticidad tras añadir el quelante BAPTA a la solución intracelular indica que la plasticidad es dependiente de calcio (Figuras R36-R38). Sin embargo, la plasticidad no se bloquea con un quelante como el EGTA (Figuras R35-R38), cuya constante de velocidad de unión al calcio es mucho menor que la del BAPTA, y que como consecuencia tiene menor efectividad para evitar la difusión del calcio que entra por la membrana plasmática (Naraghi & Neher 1997; Fakler & Adelman 2008). Por tanto, este bloqueo por BAPTA, pero no por EGTA, indica que la fuente de calcio está próxima al sensor de calcio, coincidiendo con otras plasticidades intrínsecas dependientes de calcio descritas, en las que la fuente y el sensor de calcio se encuentran en un nanodominio (Wu et al. 2008; Anderson et al. 2010a; Berkefeld et al. 2010).
- El bloqueo de la plasticidad en presencia de níquel y mibefradil, dos bloqueantes de la corriente de calcio tipo T (Figuras R40-R42).
- La aplicación de AP5, un antagonista de los receptores NMDA, no bloquea la inducción de la plasticidad (Figura R39). Si bien es cierto que varios autores han observado la implicación de los receptores NMDA en la expresión o actividad de canales de potasio como los Kv4, SK o HCN (Fan et al. 2005; Ngo-Anh et al. 2005; Kim et al. 2007), no se esperaba que estos receptores estuvieran implicados en la inducción de la plasticidad descrita en esta tesis, debido a las condiciones de registro utilizadas, en las que la actividad de la rodaja era muy baja, y a que la plasticidad descrita es inducida a potenciales subumbrales.

- La aplicación de níquel a la solución extracelular suprime el efecto de la despolarización sostenida sobre la corriente tipo A (Figura R43), tanto el aumento de corriente como el enlentecimiento de la constante de tiempo de inactivación. Por lo tanto, para la inducción de la plasticidad se requiere la entrada de calcio por los canales Cav3, implicados en la corriente tipo T. La implicación de estos canales como fuente de calcio parece coherente debido a dos factores:
 - Son canales de calcio de bajo umbral que se activan a potenciales de la membrana próximos al potencial de reposo (Bean & Mcdonough 1998; Perez-Reyes 2003; Iftinca & Zamponi 2009), similares a aquellos en los que se induce la plasticidad intrínseca a corto plazo descrita en esta tesis.
 - Los canales Cav3 se expresan fundamentalmente en dendritas, donde la corriente de calcio tipo T tiene un papel importante (Markram & Sakmann 1994; Magee & Johnston 1995; Craig et al. 1999; McKay et al. 2006; Beck & Yaari 2008; Crandall et al. 2010). Este patrón de expresión coincide con la localización de los canales Kv4 (Hoffman et al. 1997; Beck & Yaari 2008; Menegola et al. 2008; Trimmer 2015).

Dado que los canales tipo T tienen una expresión mayoritaria en dendritas, parece poco probable la implicación de la corriente de potasio tipo D en la plasticidad intrínseca, pues los canales Kv1 se expresan principalmente en el axón (Lai & Jan 2006; Kole et al. 2007; Gu & Barry 2011; Kim 2014; Trimmer 2015). Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado la existencia de canales Cav3 en el segmento inicial axónico (Bender & Trussell 2009; Bender et al. 2010; Martinello et al. 2015), por lo que todavía no se puede descartar la implicación de la corriente tipo D en la plasticidad intrínseca a corto plazo.

2.6. Mecanismo de inducción de la plasticidad intrínseca a corto plazo.

Los experimentos realizados durante la tesis muestran un incremento de la corriente tipo A y un enlentecimiento de su constante de tiempo de inactivación al despolarizar sostenidamente la membrana a -60 mV, en comparación con -80 mV (Figura R34). Esta plasticidad intrínseca es dependiente de calcio (Figuras R36-38) y se bloquea con níquel y mibefradil (Figuras R40-R43), por lo que la fuente del calcio necesario para la inducción de la plasticidad procede de los canales tipo T.

En los últimos años, varios estudios han mostrado una interacción entre las corrientes tipo A y tipo T (Molineux et al. 2005; Anderson et al. 2010 a; Anderson et al. 2010 b; Anderson et al. 2013; Heath et al. 2014). Anderson y colaboradores demostraron la existencia de complejos de señalización entre los canales Cav3 y Kv4 en neuronas de cerebelo, hipocampo y neocórtex (Anderson et al. 2010 a; Anderson et al. 2010 b). Además, observaron que el bloqueo de los canales Cav3 con mibefradil producía un desplazamiento hacia la izquierda de la curva de inactivación de la corriente tipo A. Los resultados de la tesis sugieren que la expresión de la plasticidad intrínseca inducida por una despolarización subumbral depende del porcentaje de los canales Kv4.2 modulados por los canales Cav3.2. Los estudios de *western-blot* muestran un incremento de la relación Cav3.2/Kv4.2 durante el desarrollo, fundamentalmente debido a una disminución en la expresión de los canales Kv4.2 (Figura R44). A pesar del aumento de la relación entre Cav3.2/Kv4.2 durante el desarrollo, se pueden plantear dos hipótesis sobre la evolución de los complejos Cav3.2/Kv4.2 durante el desarrollo postnatal:

- Podría aumentar la cantidad de complejos Cav3-Kv4 durante el desarrollo postnatal.
- O bien, podría no variar la cantidad de complejos Cav3-Kv4 durante el desarrollo. En esta situación, la mayor expresión de los canales Kv4 no modulados en el grupo P10, con respecto de los grupos P17 y P31, podría enmascarar los efectos de la plasticidad intrínseca en el grupo P10.

Ambas hipótesis justificarían que la plasticidad intrínseca a corto plazo se exprese a partir de los 16 días de edad postnatal. No obstante, la expresión de los canales Cav3.2 similar en los tres grupos de edad contrasta con el incremento de la densidad de corriente de calcio tipo T descrito en el período de edad comprendido entre los 9 y los 19 días (Sánchez-Alonso et al. 2010). Estas discrepancias podrían deberse a que en el grupo P9-12 hubiera una mayor proporción de

canales Cav3.2 invaginados en vesículas que en el grupo P16-19, y que por tanto no fueran funcionalmente activos. Además, los estudios de *western-blot* se realizaron en hipocampo completo, y la corriente tipo T se expresa en más tipos neuronales del hipocampo (Avery & Johnston 1996; Martinello et al. 2015). Por lo tanto, si el patrón de expresión temporal del canal Cav3.2 de las neuronas piramidales de CA1 es diferente al de otros tipos neuronales del hipocampo, la expresión total del canal Cav3.2 en el hipocampo podría no variar durante el desarrollo, aunque sí lo hiciera en las neuronas piramidales de CA1. Tampoco podría descartarse la implicación de otros subtipos de canales en la plasticidad, pues Anderson y colaboradores demostraron que los canales Kv4.2 también co-inmunoprecipitaban con los canales Cav3.3 (Anderson et al. 2010 a). En ratas adultas se ha observado que las neuronas piramidales de CA1 expresan las tres isoformas de los canales Cav3.x (Talley et al. 1999; Craig et al. 1999; McKay et al. 2006). La constante de tiempo de inactivación del canal Cav3.3 es unas 5 veces más lenta que la de los canales Cav3.1 y Cav3.2 (Perez-Reyes 2003). Por tanto, un incremento en la expresión del canal Cav3.3 permitiría una mayor entrada de calcio debido a su lenta constante de tiempo de inactivación, provocando una mayor modulación del canal Kv4.2 por calcio.

An y colaboradores demostraron la existencia de tres isoformas de proteínas de interacción con los canales Kv4 (KChIP1-3) que forman complejos con el canal Kv4 (An et al. 2000). Estas KChIPs tienen dominios de unión al calcio. Anderson y colaboradores observaron que tras añadir anticuerpos anti-KChIP3 en la solución intracelular, la curva de inactivación de la corriente tipo A se desplazaba hacia la izquierda de un modo similar al desplazamiento producido tras bloquear los canales Cav3 con mibefradil (Anderson et al. 2010 a). Sin embargo, la aplicación de anticuerpos anti-KChIP1-2 no produjo este desplazamiento de la curva de inactivación. En neuronas del grupo P16-19 registradas durante esta tesis, la aplicación de anticuerpos anti-KChIP3 a la solución intracelular bloquea la inducción de la plasticidad intrínseca a corto plazo (Figuras R45-R46). Por tanto, los resultados sugieren que en el complejo de señalización Cav3-Kv4, la KChIP3 es el sensor al que se une el calcio que entra por los canales Cav3 tras despolarizar sostenidamente la membrana. La unión del calcio a la KChIP3 provocaría un desplazamiento hacia la derecha en la curva de inactivación de la corriente tipo A, que explicaría el incremento de la corriente tipo A máxima y el enlentecimiento de la constante de tiempo de inactivación que se aprecia tras despolarizar sostenidamente el potencial de la membrana. Teniendo en cuenta la importancia de la KChIP3 como sensor de calcio necesario para la inducción de la plasticidad intrínseca, no se puede descartar la hipótesis de que los canales Kv4 en el grupo de edad P9-12 estuvieran asociados con KChIPs distintas a la KChIP3, de manera que la modulación por calcio de

los canales Kv4 que forman complejos con los canales Cav3 en el grupo P9-12 fuera diferente a la producida en los complejos Cav3-Kv4 expresados en el grupo P16-19.

La implicación de la proteína de interacción KChIP3 como sensor de calcio es un aspecto importante que descarta la posible contribución de la corriente de potasio tipo D (cuyo papel parecía poco probable dada la expresión mayoritaria de los canales Cav3 en dendritas, mientras que la expresión de los canales Kv1 es axónica). Trabajos previos han demostrado la unión selectiva de la KChIP3 con los distintos miembros de la familia de los canales de potasio Kv4.x (Gutman et al. 2005; Pongs & Schwarz 2010), lo cual elimina la posible implicación de otros canales de potasio que no tengan afinidad por la KChIP3. Además, al contrario que las KChIPs, las subunidades auxiliares Kv β , que se unen intracelularmente a los canales implicados en la corriente tipo D, carecen de dominios de unión a calcio (Pongs & Schwarz 2010).

El perfil temporal de la plasticidad (el aumento progresivo de su magnitud con el tiempo hasta su estabilización en torno a los 5 minutos) sugiere que la inducción podría explicarse por una entrada continuada de calcio a -60 mV hacia la KChIP3, debido a una corriente persistente de calcio y/o a un equilibrio entre la activación y la inactivación dependiente de voltaje y de tiempo de los canales Cav3. De hecho, la constante de tiempo de inactivación de la corriente de calcio tipo T es mucho más lenta cuanto más hiperpolarizado es el potencial de la membrana (Takahashi et al. 1991; Thompson & Wong 1991; Sánchez-Alonso et al. 2010). No obstante, una mayor despolarización podría incrementar la magnitud de la plasticidad debido a una mayor entrada de calcio por los canales Cav3. Se podría evaluar esto con futuros experimentos bloqueando la corriente persistente de sodio con TTX para despolarizar el umbral de disparo, si bien se perdería el carácter fisiológico del estudio, dado que en condiciones fisiológicas, la fijación a un potencial más despolarizado provocaría en la neurona un estado supraumbral en el que se verían implicadas otras corrientes de alto umbral. Sin embargo, las relaciones entre la duración de la despolarización y el grado de plasticidad podrían no verse explicadas por completo por las propiedades de los canales tipo T. En este sentido podría haber otros mecanismos adicionales por los que despolarizaciones subumbrales o supraumbrales pudieran inducir cambios adaptativos para prevenir una actividad excesiva. Por ejemplo, otras fuentes de calcio podrían tener un papel bajo condiciones fisiológicas en las cuales el incremento de la despolarización sea supraumbral. En estas condiciones, el papel de canales de calcio de alto umbral, como los tipo L, sobre la modulación de la excitabilidad no puede excluirse. Estudios en los que se han generado despolarizaciones con elevadas concentraciones de potasio extracelular (Grubb & Burrone 2010; O'Leary et al. 2010) o mediante tetanizaciones (Wu et al. 2008) han mostrado una reducción

homeostática de la excitabilidad neuronal inducida por el calcio que entra a través de los canales tipo L.

2.7. Expresión de la plasticidad intrínseca a corto plazo.

Los resultados de esta tesis muestran una especificidad de la plasticidad intrínseca restringida a las neuronas piramidales de CA1 del hipocampo, pues la plasticidad no se expresa en interneuronas de CA1 ni en neuronas piramidales de CA3 (Tabla R10, Figura R19). Esta especificidad contrasta con la co-inmunoprecipitación de los canales Cav3 y Kv4.2 descrita por Anderson y colaboradores (2010) en numerosas áreas, como cerebelo, hipocampo o neocorteza. Las neuronas piramidales de CA3 se establecen en el *stratum pyramidale* 3 o 4 días más tarde que las piramidales de CA1 (Frotscher & Seress 2007), por lo que hay un retraso en su desarrollo. El escaso incremento en la duración producido en las neuronas piramidales de CA3 registradas al despolarizar sostenidamente la membrana, unido a la presencia de las corrientes tipo A y tipo T en estas neuronas (Mogul & Fox 1991; Avery & Johnston 1996; Mitterdorfer & Bean 2002), sugiere que las neuronas piramidales de CA3 podrían expresar esta plasticidad más adelante, pero existe un retraso en la ventana de expresión de la misma con respecto a las neuronas piramidales de CA1. En cuanto a las interneuronas, parece menos probable que terminen desarrollando esta plasticidad a la vista del gran incremento en la duración del PA generado tras despolarizar sostenidamente su potencial de la membrana. Zhang y McBain también observaron un incremento en la duración del PA generado en estas interneuronas tras fijar la membrana a potenciales subumbriles más despolarizados, y la magnitud del mismo era directamente proporcional a la despolarización del potencial de fijación (Zhang & McBain 1995 b). Las interneuronas que se encuentran en el área CA1 presentan canales implicados en la corriente tipo A (Zhang & McBain 1995a; Zhang & McBain 1995b; Martina et al. 1998), y canales Kv3, implicados en una corriente rectificadora retardada rápida de potasio con las siguientes características: es de alto umbral, tiene una rápida activación y una rápida desactivación, y su inactivación es lenta (Zhang & McBain 1995a; Du et al. 1996; Martina et al. 1998; Rosato-Siri et al. 2015; Taskin et al. 2015). El papel de estos canales Kv3 es muy importante en las interneuronas debido a sus propiedades cinéticas, permitiendo que las interneuronas disparen PAs de corta duración, a alta frecuencia y sin presentar acomodación, motivos por los que se conoce a estas neuronas como de disparo rápido (*fast-spiking*) (Zhang & McBain 1995b; Martina et al. 1998; Lien & Jonas 2003). Sin embargo, en un estudio sobre las corrientes de calcio que presentaban las interneuronas de CA1,

se registraron varias corrientes de alto umbral, pero no presentaban una corriente de bajo umbral de tipo T prominente (Lambert & Wilson 1996). Con estudios de inmunohistoquímica, Vinet y Sik observaron la expresión de la isoforma Cav3.1 en interneuronas de CA1 adultas asociando a este canal una contribución en las oscilaciones neuronales intrínsecas más que a un cambio del patrón de disparo a ráfagas (Vinet & Sik 2006). Por lo tanto, la corriente tipo A de las interneuronas no es modulada por calcio.

2.8. Implicaciones funcionales de la plasticidad intrínseca a corto plazo.

El hipocampo de rata extiende su maduración a períodos postnatales. La conectividad sináptica (Hsia et al. 1998; Groc et al. 2003) y las características morfológicas (Liao et al. 1999) de las neuronas piramidales de CA1 comienzan a adquirir las características de neurona madura a partir de la segunda semana, coincidiendo con el período de apertura de ojos. Alrededor de esta etapa de desarrollo, el animal se vuelve más activo y tiene un comportamiento más exploratorio que es dependiente de la actividad del hipocampo (Langston et al. 2010). El incremento de la actividad del circuito requiere el desarrollo de mecanismos del control de la excitabilidad. Los resultados obtenidos durante esta tesis sugieren un posible mecanismo adaptativo por el cual las neuronas pueden disminuir su excitabilidad en respuesta a despolarizaciones subumbrales sostenidas.

La modulación de la corriente tipo A por calcio produce un aumento de esta corriente que puede limitar la frecuencia de PAs generados en dendritas (Hoffman et al. 1997; Johnston et al. 1999; Johnston et al. 2000). Además, un aumento de la corriente tipo A disminuye la amplitud de los PEPSs, limita la sumación espacial sólo a entradas temporalmente muy próximas y disminuye la amplitud de los PAs retropropagados (Hoffman et al. 1997; Johnston et al. 1999; Migliore et al. 1999; Johnston et al. 2000; Magee 2000; Ramakers & Storm 2002; Watanabe et al. 2002). La precisión temporal entre el PEPS y el PA retropropagado es necesaria para la generación de una potenciación a largo plazo (LTP) asociativa en las neuronas piramidales de CA1 (Debanne 1996; Hoffman et al. 1997; Magee & Johnston 1997; Debanne et al. 1998; Caporale & Dan 2008). Además, Jung y colaboradores observaron un remodelado de la sinapsis en neuronas de CA1 que sobreexpresaban los canales Kv4.2 (Jung & Hoffman 2009). Estas neuronas con la corriente tipo A incrementada mostraron una disminución en la composición relativa NR2B/NR2A de los receptores NMDA y no exhibían LTP. Por lo tanto, un incremento de la corriente tipo A disminuye

la excitabilidad dendrítica y la generación de esta plasticidad sináptica a largo plazo (Hoffman et al. 1997; Ramakers & Storm 2002; Watanabe et al. 2002).

Esta forma de plasticidad, como otras descritas, muestra que la actividad neuronal, como muchas otras variables fisiológicas críticas, está sujeta a un control clásico de retroalimentación negativa (Nelson & Turrigiano 2008). Quizá es debido a esta regulación global de la actividad neuronal que las interneuronas de CA1 no expresen la modulación de la corriente tipo A por calcio que se ha descrito durante esta tesis. Dado su efecto inhibitorio sobre neuronas excitatorias como son las neuronas piramidales de CA1, la expresión de esta plasticidad en las interneuronas de CA1 provocaría un estado de hiperexcitabilidad en el circuito hipocampal. Diferente es el caso de las neuronas estrelladas de cerebelo, cuyo papel inhibitorio sobre un circuito que es fundamentalmente inhibitorio hace que la formación de los complejos Cav3-Kv4 en estas neuronas (Anderson et al. 2010a; Anderson et al. 2010b; Anderson et al. 2013; Heath et al. 2014) sea un mecanismo de control de la inhibición que ejercen estas neuronas sobre las células de Purkinje.

Una desregulación de este tipo de mecanismos homeostáticos podría provocar un disparo descontrolado y finalmente desórdenes neurológicos de hiperexcitabilidad, como la epilepsia. En este sentido, se ha observado que algunas canalopatías producidas durante el período de crisis epilépticas recurrentes, se caracterizan por una expresión disminuida de los canales Kv4 o de las KChIPs (Bernard et al. 2004; Monaghan et al. 2008).

2.9. Resumen.

Se ha identificado una nueva forma de plasticidad homeostática a corto plazo dependiente de calcio en las neuronas piramidales de CA1 que disminuye la excitabilidad intrínseca de la neurona en respuesta a una despolarización subumbral sostenida del potencial de la membrana. El perfil temporal para su total expresión es de algunos minutos, lo cual difiere con otras formas de plasticidad homeostática que requieren horas o días para su establecimiento (Grubb & Burrone 2010; O’Leary et al. 2010). A lo largo de la tesis se han caracterizado varios aspectos de la plasticidad intrínseca a corto plazo:

- Su papel sobre la morfología del PA y la excitabilidad neuronal.
- Su perfil temporal de inducción y de extinción.

- Su especificidad dentro del hipocampo, restringida a las neuronas piramidales de CA1.
- Su expresión mediante un incremento de la corriente de potasio tipo A y un enlentecimiento de su constante de tiempo de inactivación.
- Su inducción mediada por el calcio que ingresa por los canales tipo T y por la existencia de complejos de señalización Cav3-Kv4 en nanodominios donde la proteína KCHIP3 actúa como sensor de calcio.

Como la plasticidad intrínseca a corto plazo se genera con potenciales subumbrales, se sugiere que asimismo modula la fiabilidad para la generación de un PA provocado por una activación sináptica en función del potencial de la membrana reciente. Los cambios generados por esta plasticidad pueden tener consecuencias neurofisiológicas para la plasticidad sináptica, para la integración neuronal y para la liberación de neurotransmisores. La importancia de entender este tipo de plasticidades va más allá de entender la fisiología celular básica, pues alteraciones en los mecanismos responsables de este tipo de homeostasis pueden contribuir a la aparición de patologías asociadas con la hiperexcitabilidad, como la epilepsia.

3. Efectos del calcio extracelular sobre la excitabilidad intrínseca de las neuronas piramidales de CA1.

3.1. La concentración extracelular de calcio afecta a la morfología del PA.

Desde finales del siglo XIX se ha reconocido que el calcio es un ion fundamental para la excitabilidad, y actúa desde el interior y el exterior de la célula. Cuando se eleva el calcio intracelular, se ponen en marcha distintos procesos, tales como apertura de canales, cascadas de señalización y movilización de vesículas. Dichos efectos son específicos del calcio, puesto que no se producen al sustituir dicho ion por magnesio (Hille 2001). Extracelularmente, el calcio además de ser una importante fuente de suministro, tiene un papel fundamental en el control de la excitabilidad neuronal. Así, el aumento de su concentración extracelular despolariza el umbral de disparo al desplazar hacia la derecha las curvas de activación e inactivación de los canales implicados en la corriente transitoria de sodio. Por el contrario, la disminución de su concentración extracelular produce hiperexcitabilidad. En los años cincuenta se propuso la teoría del potencial de superficie para explicar estos cambios de excitabilidad (Frankenhauser & Hodgkin 1957; Hille 1968; Hille 2001). Sin embargo, dichos efectos extracelulares del calcio no son exclusivos de este ion, ya que otros iones divalentes los presentan. El aumento de la concentración del calcio extracelular produce también un desplazamiento hacia la derecha de las curvas de activación de otros canales, como los implicados en las corrientes tipo A, otras corrientes rectificadoras retardadas de potasio, la corriente catiónica tipo H y algunas corrientes de calcio (Hahn & Campbell 1983; Mayer & Sugiyama 1988; Elinder et al. 1996; Hille 2001).

La disminución en la concentración extracelular de calcio provoca: una hiperpolarización del umbral de disparo, un aumento de la velocidad de despolarización y un aumento de la amplitud de los PAs de las neuronas registradas en la tesis (Tablas R13-R14, Figuras R47-R48). La hiperpolarización del umbral de disparo tras la reducción en la concentración extracelular de calcio ha sido descrita por otros autores (Wang et al. 2004; Aivar et al. 2014). Estos resultados pueden explicarse por la teoría del potencial de superficie, según la cual al reducir la concentración extracelular de iones divalentes, se liberarían las cargas negativas que tienen algunas moléculas situadas en la membrana externa de la bicapa lipídica, contribuyendo a disminuir la polaridad existente entre el líquido extracelular y el intracelular en su entorno (Elinder

et al. 1996; Hille 1968; Isaev et al. 2012). De este modo, la disminución de divalentes provoca una “despolarización” en el entorno de los canales de sodio que se traduce en un desplazamiento hacia la izquierda de su curva de activación, justificando los resultados obtenidos en la tesis (Hille 1968; Hahn & Campbell 1983; Hille 2001). Según se reduce la concentración extracelular de calcio (y en consecuencia de iones divalentes), se produce una hiperpolarización del pico del PA, a pesar del incremento de amplitud. Esto podría deberse al desplazamiento hacia la izquierda de la curva de inactivación de la corriente transitoria de sodio (Hille 1968; Hahn & Campbell 1983; Hille 2001), si bien se ve menos afectada que su curva de activación (Hille 1968; Hille 2001), y por ello la amplitud del PA incrementa. La curva de activación de la corriente de potasio tipo A también se ve modificada por la concentración extracelular de iones divalentes (Mayer & Sugiyama 1988), por lo que un desplazamiento hacia la izquierda también contribuiría a hiperpolarizar el pico del PA. Al restituir la concentración inicial de iones divalentes incrementando la concentración extracelular de magnesio, desaparecen las diferencias (Tabla R14, Figura R48), demostrando que los cambios mencionados son debidos a la teoría del potencial de superficie. Sin embargo, el efecto de cada tipo de ion divalente sobre la excitabilidad neuronal no es exactamente igual (Hille 1968; Mayer & Sugiyama 1988; Hille 2001; Wang et al. 2004), por lo que la sustitución de calcio por magnesio en concentración equimolar podría no haber restituido por completo los efectos producidos al disminuir la concentración extracelular de calcio.

Además, en las neuronas registradas se observa un enlentecimiento en la segunda mitad de la fase repolarizante al disminuir la concentración extracelular de calcio (Tablas R13-R14, Figuras R47-R48). Este enlentecimiento permanece cuando se sustituye el calcio por magnesio de modo equimolar (Tabla R14, Figura R48), por lo que no es debido a la concentración extracelular de iones divalentes, sino a un efecto intracelular específico del calcio. En la segunda mitad de la fase repolarizante, intervienen fundamentalmente las corrientes de potasio rectificadoras retardadas y la corriente de potasio tipo BK (Lancaster & Nicoll 1987; Storm 1987; Poolos & Johnston 1999; Sun et al. 2009; Johnston et al. 2010). Esta última es una corriente dependiente de calcio, por lo que la disminución de calcio extracelular provocaría una disminución del número de los canales KCa1.1 activados. Siguiendo esta hipótesis, otros autores observaron un enlentecimiento de la segunda mitad de la fase repolarizante al quelar la neurona con BAPTA, pero no con EGTA, asociándolo a que no se activaban las corrientes de potasio dependientes de calcio (Lancaster & Nicoll 1987; Storm 1987). Además, el bloqueo específico de los canales implicados en la corriente tipo BK con iberitoxina produce un ensanchamiento del PA en su mitad inferior (Shao et al. 1999; Gu et al. 2007; Springer et al. 2015). Por tanto, el enlentecimiento de la segunda mitad de la fase repolarizante del PA tras disminuir la concentración extracelular de

calcio se podría explicar por la ausencia de activación de los canales KCa1.1 implicados en la corriente tipo BK.

3.2. La concentración extracelular de calcio afecta a la excitabilidad neuronal.

3.2.1. La concentración extracelular de calcio no afecta a las propiedades electrofisiológicas básicas.

Las propiedades electrofisiológicas básicas no se alteran tras disminuir la concentración extracelular de calcio en las neuronas registradas en la tesis (Tabla R12), resultados similares a los descritos por Wang y colaboradores (2004). Sin embargo, Aivar y colaboradores (2014) observaron una hiperpolarización del potencial de reposo en las neuronas piramidales de CA3 (no así en interneuronas), que podría explicarse por el cierre de los canales HCN, debido al desplazamiento de la curva de activación de la corriente tipo H al disminuir la concentración de iones divalentes (Hille 2001). La hiperpolarización del potencial de reposo se podría explicar como un mecanismo homeostático para compensar el aumento de su actividad espontánea basal producido por la hiperpolarización del umbral de disparo y el desequilibrio sináptico debido al mayor efecto de los divalentes sobre el potencial de superficie en neuronas piramidales (excitatorias) que en interneuronas (inhibitorias). Este mecanismo podría ser similar al observado por O'Leary y colaboradores, que mostraron cómo ante un aumento de la excitabilidad crónico, se incrementaban las corrientes de potasio de fuga, hiperpolarizando el potencial de reposo (O'Leary et al. 2010). En las neuronas registradas durante esta tesis no se generó ningún mecanismo compensatorio que disminuyera la excitabilidad intrínseca similar al observado por O'Leary y colaboradores (2010), pues las neuronas se encontraban fijadas a -80 mV al cambiar las soluciones extracelulares, y sólo se llevó al potencial de reposo en el momento en el que se deseó medir éste.

3.2.2. La concentración extracelular de calcio afecta a la frecuencia de disparo.

Los cambios en la concentración extracelular de calcio y magnesio alteran el umbral de disparo de los PAs en las neuronas registradas en la tesis (Tablas R13-R14, Figuras R47-R48). Considerando que no presentan diferencias en las propiedades pasivas de la membrana (Tabla R12), el estudio de las propiedades de entrada-salida se realizó midiendo la frecuencia de disparo frente a la intensidad de corriente inyectada. En las curvas de entrada-salida se observa que al reducir la concentración extracelular de calcio se incrementa la frecuencia de disparo frente a pulsos de igual intensidad de corriente (Figuras R54-R55). También se aprecia que la frecuencia de disparo no cambia al sustituir el calcio extracelular por magnesio (Figura R55), por lo que el incremento en la excitabilidad neuronal se explica por la teoría del potencial de superficie (Frankenhauser & Hodgkin 1957; Hille 1968; Hahn & Campbell 1983; Hille 2001). Similar resultado ha sido publicado por Aivar y colaboradores en neuronas piramidales e interneuronas de CA3 (Aivar et al. 2014). Además, diversos autores han observado un aumento de la actividad espontánea en modelos *in vitro* e *in vivo* al disminuir la concentración extracelular de calcio o magnesio (Feng & Durand 2003; Peng et al. 2004; Wang et al. 2004; Isaev et al. 2007; Aivar et al. 2014).

El aumento de la frecuencia de disparo que se observa al disminuir la concentración extracelular de iones divalentes en las curvas de entrada-salida se produce en un cierto rango de intensidades. Para intensidades de corriente elevadas, se observa una disminución de la frecuencia de disparo al disminuir la concentración extracelular de calcio, que es mucho más acusada cuando va acompañada por una reducción en la concentración de divalentes (Figuras R54-55). Esta reducción de la frecuencia de disparo se debe a un bloqueo de la generación de los PAs por despolarización. Dicho bloqueo se produce a causa de:

- Un efecto extracelular debido al apantallamiento del potencial en la superficie externa de la membrana neuronal. La disminución de la concentración extracelular de divalentes produce un desplazamiento hacia la izquierda de la curva de inactivación de la corriente transitoria de sodio (Hahn & Campbell 1983; Hille 2001), por lo que los canales se inactivan a potenciales más hiperpolarizados. Además, la disminución en la concentración de divalentes produce un desplazamiento hacia la izquierda de la curva de activación de las corrientes tipo A de potasio y otras corrientes rectificadoras retardadas de

potasio (Mayer & Sugiyama 1988; Elinder et al. 1996; Hille 2001). Estos desplazamientos favorecen que durante el disparo repetitivo se produzca una mayor inactivación acumulativa de estas corrientes y el bloqueo de la generación de PAs por despolarización.

- Un efecto intracelular relacionado con la gran importancia en el disparo de alta frecuencia de los canales de potasio tipo BK y Kv2 (Storm 1987; Ma & Koester 1996; Du et al. 2000; Gu et al. 2007; Berkefeld et al. 2010; Gittis et al. 2010; Liu & Bean 2014). Al disminuir la concentración extracelular de calcio no se activan los canales KCa1.1, provocando una repolarización menos eficaz. Ikemoto y colaboradores observaron que hay un cierto retraso entre la entrada de calcio tras la despolarización producida por un PA y la activación de los canales implicados en la corriente tipo BK (Ikemoto et al. 1989), por lo que la repolarización del primer PA no se vería excesivamente afectada, pero sí la de los siguientes durante un disparo repetitivo. Esto retrasa la recuperación de la inactivación de los canales de sodio necesarios para la generación de un nuevo PA (Gu et al. 2007; Gittis et al. 2010), y por tanto contribuye a que se produzca un bloqueo de la generación de PAs cuando las intensidades de corriente son suficientemente elevadas.

3.2.3. La concentración extracelular de calcio afecta a la despolarización postpotencial y al patrón de disparo.

El disparo en ráfagas es importante para el procesamiento y almacenaje de información, y por tanto para la consolidación de nuevas memorias, proceso en el cual el hipocampo es una estructura fundamental (Cattaneo et al. 1981; Buzsaki 1989; Magee & Carruth 1999). La teoría propuesta para la generación de un disparo en ráfagas propone que el PA somático retropropagado recluta canales de calcio dependientes de voltaje presentes en las dendritas apicales (Magee & Carruth 1999), de modo que la corriente de calcio genera unas espigas dendríticas de calcio que refuerzan la ADP del PA somático, provocando la generación de un disparo en ráfagas (Magee & Carruth 1999). Varios autores han demostrado que durante el período de edad comprendo entre los 14 y 20 días se genera una ADP en las neuronas piramidales de CA1 en la que las corrientes tipo R y tipo T de calcio son fundamentales (Chen et al. 2005; Metz et al. 2005; Sánchez-Alonso et al. 2010).

En las neuronas del grupo P16-19 registradas durante la tesis disminuye la duración y la amplitud de la ADP al reducir la concentración extracelular de calcio, incluso si se mantiene equimolar la concentración extracelular de divalentes al incrementar la concentración de magnesio (Tabla R15; Figuras R49-R50), sugiriendo que la entrada específica de calcio es fundamental para la generación de la ADP. Asimismo, disminuye la duración y la amplitud de la ADP tras añadir níquel (500 μM) o mibefradil (10 μM) a la solución extracelular (Figura R51). Existe una gran relación entre la amplitud y la duración de la ADP y el patrón de disparo regular o en ráfagas (Jensen et al. 1996; Chen et al. 2005; Metz et al. 2005; Jarsky et al. 2008; Sánchez-Alonso et al. 2010). En las neuronas registradas durante la tesis, se observa usualmente en condiciones control un patrón de disparo consistente en una ráfaga de 2 o 3 PAs, seguidos de una serie de PAs individuales y con frecuencia uniforme (Figura R52). Dicho comportamiento es similar al descrito por otros autores (McCormick et al. 1985; Metz et al. 2005; Chen et al. 2005; Jarsky et al. 2008; Sánchez-Alonso et al. 2010; Sánchez-Alonso et al. 2012). Otros autores han demostrado que el patrón de disparo varía con el potencial de fijación, y que al hiperpolarizar la membrana disminuye el disparo en ráfagas (Spigelman et al. 1992; Jensen et al. 1996). Brown y Randall demostraron que aunque la amplitud de la ADP disminuía al despolarizar el potencial de la membrana, su pico máximo estaba más despolarizado, lo que podría ser suficiente para que aumente el patrón de ráfagas al despolarizar la membrana (Brown & Randall 2009). En la Figura D5 se muestra un registro representativo donde se puede apreciar que el patrón de disparo en ráfagas es más acusado al fijar el potencial de la membrana a -60 mV que a -80 mV .

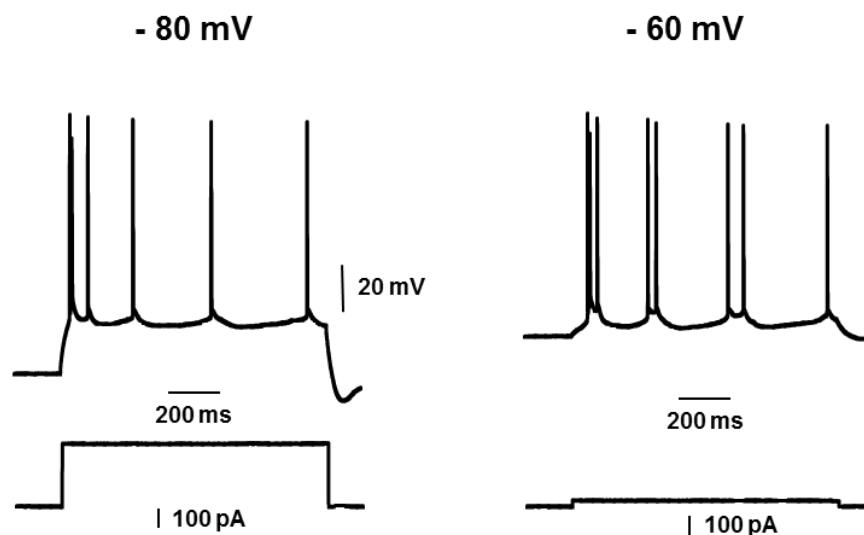


Figura D5: El patrón de disparo en ráfagas es visualmente más acusado al despolarizar la membrana.

Registros representativos en los que se muestra cómo el patrón de disparo en ráfagas es más claro al fijar el potencial de la membrana a -60 mV (derecha) que a -80 mV (izquierda).

Las neuronas del grupo P16-19 registradas durante la tesis presentan un cambio en el patrón de disparo al disminuir la concentración extracelular de calcio, de modo que la mayoría de las células disparan con un patrón regular (Figura R52). Este cambio de disparo en ráfaga a disparo regular también se produce al añadir níquel (500 μ M) o mibefradil (10 μ M) a la solución extracelular control (Figura R53). Los resultados descritos son similares a los observados por otros autores (Magee & Carruth 1999; Jung et al. 2001; Chen et al. 2005; Metz et al. 2005; Sánchez-Alonso et al. 2010), y demuestran la importancia que tiene la entrada de calcio por los canales tipo T para la generación de la ADP y del disparo en ráfagas en el período de edad estudiado.

Sin embargo, otros autores han rechazado la hipótesis del calcio debido a que persistían las ráfagas tras bloquear las corrientes de calcio (Azouz et al. 1996; Mattia et al. 1997; Su et al. 2001; Yue et al. 2005; Chen et al. 2011). La hipótesis alternativa que apoyan estos autores implica la activación de la corriente persistente de sodio en el soma o en sus proximidades, la cual aumenta la ADP del PA somático a potenciales supraumbrales para generar un disparo en ráfagas, en base al bloqueo de la generación de la ADP y el comportamiento en ráfagas al añadir los bloqueantes de la corriente persistente de sodio, TTX o riluzol (Azouz et al. 1996; Su et al. 2001; Menendez de la Prida 2003; Yue et al. 2005; Chen et al. 2011). Incluso, algunos autores observaron que en ausencia de calcio extracelular se mantenían las ráfagas (Azouz et al. 1996; Menendez de la Prida 2003) o aumentaban (Jung et al. 2001; Su et al. 2001). Su y colaboradores (2001) justificaban el aumento de las ráfagas al disminuir la concentración extracelular de calcio por dos razones: 1) Disminuye la oposición de la corriente tipo BK, que interviene en la AHP rápida. 2) Un aumento de la corriente persistente de sodio al reducir el calcio extracelular. Esto podría ser debido a una reducción del efecto de apantallamiento de la superficie externa al disminuir los divalentes (teoría del potencial de superficie) o a la modulación por calcio de los canales, bien directamente, bien a través de receptores acoplados a proteínas G.

Estos dos mecanismos no son excluyentes y pueden actuar sinérgicamente para generar el comportamiento en ráfagas, dado que son varias las corrientes implicadas en la generación de la ADP (Chen et al. 2005). Además, el intervalo de expresión de las corrientes de calcio y de sodio mencionadas anteriormente no es igual durante el desarrollo. La corriente de calcio tipo T es una corriente muy importante en las primeras etapas del desarrollo embrionario, y se incrementa durante las primeras semanas hasta alcanzar un máximo en torno a los 15-20 días (Kortekaas & Wadman 1997; Sánchez-Alonso et al. 2010). En este intervalo de edad se produce un aumento de la amplitud y de la duración de la ADP, y un incremento del porcentaje de células que disparan en ráfagas, con un máximo en P18-P19, y ese patrón en ráfagas se bloquea con níquel (Chen et al. 2005; Metz et al. 2005; Sánchez-Alonso et al. 2010). A partir de los 18-20 días comienza a

disminuir la duración de la ADP hasta alcanzar valores adultos en P24-P25, y como consecuencia vuelve a descender el porcentaje de células que disparan en ráfagas (Chen et al. 2005). Esta disminución de la duración de la ADP coincide con la pérdida de importancia de la corriente tipo T debido al incremento de las corrientes de calcio de alto umbral (Kortekaas & Wadman 1997; Ribeiro & Costa 2000). Además, el incremento de la expresión del canal Kv7.2 durante el desarrollo (Safiulina et al. 2008) podría dificultar la propagación de la corriente de calcio al soma y contribuir a que disminuya la duración de la ADP, ya que la corriente tipo M se opone a la generación de la ADP. Chen y colaboradores mostraron que el calcio es muy importante para la generación del comportamiento en ráfaga en el intervalo P15-P20, pues añadiendo el agonista de los canales de calcio tipo L, BAY-K8644, se incrementaba el disparo en ráfagas (Chen et al. 2005). Sin embargo, la adición de BAY-K8644 en neuronas adultas no produjo ningún efecto, sugiriendo que en las neuronas adultas no tenía tanta importancia el calcio dendrítico para la generación de las ráfagas. Durante el desarrollo también se incrementa la corriente persistente de sodio (Lunko et al. 2014), y los trabajos en los que el principal componente de la ADP es la corriente persistente de sodio están realizados con edades superiores al mes de vida postnatal (Jensen et al. 1996; Mattia et al. 1997; Su et al. 2001; Chen et al. 2005; Chen et al. 2011). En resumen, en el período comprendido entre los 16 y 19 días la corriente tipo T de calcio es la principal corriente encargada de la ADP, mientras que en neuronas adultas podría predominar la corriente transitoria de sodio.

3.3. Resumen.

El calcio es un ion fundamental para la excitabilidad neuronal. A nivel extracelular produce un efecto de apantallamiento del potencial en la superficie externa de la membrana neuronal, debido a su interacción con cargas negativas procedentes del ácido siálico, fosfatos, aminoácidos y lípidos cargados, y otras moléculas cargadas que crean campos eléctricos locales cerca de los sensores de voltaje de los canales (Elinder et al. 1996; Hille 2001; Isaev et al. 2012). Este apantallamiento no es específico del calcio, sino que se debe a su condición de ion divalente. Su reducción en el medio extracelular produce un desplazamiento hacia la izquierda de las curvas de activación y de inactivación de la corriente transitoria de sodio, y un desplazamiento hacia la izquierda de las curvas de activación de otras corrientes como las tipo A, tipo H, otras rectificadoras retardadas de potasio, y algunas corrientes de calcio (Hahin & Campbell 1983; Mayer & Sugiyama 1988; Elinder et al. 1996; Hille 2001).

Además el calcio tiene efectos intracelulares que también determinan la excitabilidad neuronal. Uno de sus efectos es la activación de los canales de potasio dependientes de calcio.

Entre ellos se encuentran los canales tipo BK, cuya activación tiene un papel en la repolarización del PA y en el control de la frecuencia de disparo (Lancaster & Nicoll 1987; Storm 1987; Ma & Koester 1996; Poolos & Johnston 1999; Du et al. 2000; Gu et al. 2007; Sun et al. 2009; Johnston et al. 2010; Gittis et al. 2010; Liu & Bean 2014; Springer et al. 2015).

Por último, el calcio tiene un papel fundamental en la generación de una ADP en las neuronas piramidales de CA1 durante el período de edad estudiado (P16-19) a través de corrientes como las tipo R y tipo T de calcio. Como consecuencia hay un porcentaje de neuronas muy elevado con un patrón de disparo en ráfagas durante este período de edad (Chen et al. 2005; Metz et al. 2005; Sánchez-Alonso et al. 2010).

La disminución de la concentración extracelular de calcio provoca en las neuronas registradas:

- Una hiperpolarización del umbral de disparo y un incremento de la frecuencia debido a un desplazamiento hacia la izquierda de la curva de activación de la corriente transitoria de sodio. Estos efectos se revirtieron al aumentar la concentración extracelular de magnesio, pues son debidos al apantallamiento que los divalentes extracelulares producen sobre las cargas negativas de la membrana neuronal en las proximidades de los sensores de voltaje de los canales.
- Una disminución de la velocidad de la segunda mitad de la fase repolarizante al disminuir la actividad de la corriente BK.
- Un bloqueo en la generación de PAs cuando los estímulos despolarizantes son de alta intensidad, debido a la inactivación de los canales implicados en la corriente transitoria de sodio. Dicho resultado se produce principalmente por el desplazamiento de la curva de inactivación del sodio al reducir la concentración extracelular de iones divalentes, pero la menor actividad de los canales de potasio tipo BK también contribuye a que la fase de repolarización sea menos eficiente.
- Una disminución en la amplitud y duración media de la ADP que contribuye a que el patrón de disparo sea regular. Este resultado se explica considerando que en el período de edad estudiado se relaciona la generación de la ADP y el patrón de disparo en ráfagas con que la corriente de calcio tipo T alcanza su máxima amplitud.

4. Discusión general.

4.1. Mecanismos homeostáticos de la excitabilidad neuronal durante el desarrollo.

El hipocampo de rata es conocido por madurar tardíamente durante el desarrollo, y extiende su maduración hasta períodos postnatales. Durante las primeras semanas de edad postnatal se produce un enorme desarrollo de las características morfológicas (Pokorny & Yamamoto 1981a; Pokorny & Yamamoto 1981b; Schwartzkroin & Kunkel 1982; Liao et al. 1999) y de la conectividad sináptica (Hsia et al. 1998; Groc et al. 2003) de las neuronas piramidales de CA1. En esta etapa de desarrollo el animal se vuelve más activo y tiene un mayor comportamiento exploratorio que depende de la actividad del hipocampo (Langston et al. 2010).

Durante las primeras semanas de edad postnatal se producen cambios homeostáticos en las propiedades electrofisiológicas de las neuronas piramidales de CA1 a fin de controlar la excitabilidad neuronal ante el incremento de la actividad del circuito. Los cambios homeostáticos más importantes son los siguientes:

- El primero está íntimamente ligado al crecimiento del árbol dendrítico. Durante el desarrollo desaparece la morfología compacta inicial de las neuronas piramidales de CA1, incrementando notablemente su superficie neuronal (Pokorny & Yamamoto 1981a). Esto conlleva una disminución de la resistencia de la membrana, lo que permite que estímulos de una misma intensidad produzcan menores despolarizaciones. Además, hay una disminución de la resistividad específica durante el desarrollo (McCormick & Prince 1987; Spigelman et al. 1992) que contribuye a que disminuya la resistencia de la membrana, y también favorece la precisión temporal en la generación de un PA.
- Otro mecanismo homeostático es la hiperpolarización del umbral de disparo debido a que se produce un incremento de la corriente transitoria de sodio (Costa 1996; Potthoff & Dietzel 1997; Lunko et al. 2014) y una disminución de la corriente de potasio tipo A (Klee et al. 1995; Sánchez-Alonso et al. 2012), junto a la hiperpolarización del potencial de la membrana en reposo. Fricker y

colaboradores señalaron que la diferencia entre el potencial de reposo y el umbral de disparo es crucial para la transmisión de información entre neuronas sinápticamente conectadas (Fricker et al. 1999). Durante el desarrollo se mantiene esta diferencia relativamente constante debido a la hiperpolarización del potencial de la membrana en reposo.

- Por último, el incremento de corrientes de potasio de inactivación lenta como las tipo D, tipo BK y otras corrientes rectificadoras retardadas que aparecen durante el desarrollo (Costa et al. 1994; Klee et al. 1995; Aoki & Baraban 2000; Sánchez-Alonso et al. 2012; Giglio & Storm 2014) permiten una repolarización del PA más eficaz frente a estimulaciones prolongadas o de alta frecuencia.

Estos cambios en la excitabilidad neuronal permiten a las neuronas piramidales de CA1 procesar las múltiples aferencias que reciben debido al incremento en la actividad hipocampal, acomodando perfectamente su disparo a las distintas situaciones gracias a las nuevas corrientes dependientes de calcio. También se generan mecanismos reguladores plásticos que modifican temporalmente la excitabilidad neuronal. Así, se ha descrito durante esta tesis la generación de una plasticidad intrínseca a corto plazo a partir de los 16 días de edad postnatal que se caracteriza por aumentar la cantidad de corriente de potasio tipo A tras una despolarización subumbral sostenida. Otras plasticidades homeostáticas a largo plazo también han sido descritas por diferentes laboratorios (Fan et al. 2005; Grubb & Burrone 2010; O'Leary et al. 2010; Tong et al. 2010; Steinert et al. 2011), en las que se incrementan corrientes repolarizantes en respuesta a aumentos de la excitabilidad neuronal.

4.2. Importancia del calcio a nivel de circuitos.

Las capacidades cognitivas de animales y humanos dependen de cambios de estado en el cerebro. Estos cambios de estado se han atribuido a fluctuaciones en el potencial de la membrana de neuronas individuales (Fujisawa et al. 2006). Muchos tipos neuronales fluctúan entre dos niveles de potencial de la membrana, refiriéndose como estados *up* y *down* (Wilson & Kawaguchi 1996; Anderson et al. 2000; Petersen et al. 2003; Fan et al. 2005). El estado *down* coincide con períodos en los que la neurona se encuentra en potenciales relativamente hiperpolarizados (el potencial oscila entre los -75 y -85 mV), mientras que en el estado *up* la neurona se mantiene en valores despolarizados próximos al umbral de disparo de PAs (entre -65 y -50 mV) (O'Donnell &

Grace 1995; Wilson & Kawaguchi 1996; Anderson et al. 2000; Heyward et al. 2001; Sachdev et al. 2004). Los cambios en la excitabilidad intrínseca neuronal son cruciales durante el desarrollo de los patrones de disparo y en el establecimiento de ritmos neuronales como los estados *up* y *down* (Leung & Yim 1991; Hu et al. 2002; Hu et al. 2009). Así, en las neuronas del tálamo se produce un cambio en su patrón de disparo según el estado en el que se encuentren: disparan tónicamente con un patrón regular cuando su potencial de reposo es más despolarizado que -55 mV y en ráfagas cuando el potencial de reposo está más hiperpolarizado que -60 mV (Llinás & Steriade 2006; De Ridder et al. 2015). En estos cambios de patrón de disparo se ha dado gran importancia a la corriente catiónica tipo H y la corriente de calcio tipo T (Llinás & Steriade 2006). Varios autores han demostrado que el patrón de disparo también varía con el potencial de fijación en las neuronas piramidales del hipocampo (Spigelman et al. 1992; Jensen et al. 1996), si bien el patrón de disparo seguido en cada potencial de la membrana es el inverso, como se puede observar en la Figura D5. La forma de plasticidad intrínseca identificada en esta tesis podría contribuir a disminuir la excitabilidad neuronal durante estos estados en los que el potencial de la membrana se encuentra despolarizado.

Además de modular el patrón de disparo y plasticidades intrínsecas en respuesta a estas fluctuaciones del potencial de reposo, el calcio también tiene un papel importante en el control de oscilaciones de alta frecuencia (Aivar et al. 2014). Fisiológicamente, se producen oscilaciones de alta frecuencia en el hipocampo (100-200 Hz durante un período de tiempo inferior a los 100 ms), que se corresponden con períodos intermitentes en los que se ve incrementada la actividad de las neuronas piramidales de una forma rítmica debido a la regulación mediante interneuronas inhibitorias perisomáticas (Buzsáki et al. 1992; Menendez de la Prida et al. 2014). La reducción de los niveles de calcio extracelular provoca un aumento de la excitabilidad neuronal y un desequilibrio excitación/inhibición, que se ve reflejado en la generación de unas oscilaciones de alta frecuencia más rápidas (su frecuencia es superior a 200 Hz) y con mayor amplitud debido que se pierde el control ejercido por las interneuronas perisomáticas (Aivar et al. 2014).

4.3. Alteraciones de la homeostasis. Hiperexcitabilidad.

Como se ha explicado previamente, durante el desarrollo se establecen una serie de sistemas de control para asegurar que el funcionamiento de los circuitos neuronales sea el correcto. Alteraciones de estos sistemas de control pueden provocar situaciones de hiperexcitabilidad.

La epilepsia es una de las patologías neurológicas más frecuentes. Las descargas epilépticas corresponden a una actividad neuronal muy sincronizada y de alta frecuencia. En este aumento de la excitabilidad se piensa que está aumentada la relación entrada-salida de las neuronas (Reyes 2001). Estos cambios en la relación entrada-salida pueden estar causados por cambios plásticos a nivel sináptico (Cohen et al. 2002) y por cambios en los canales iónicos que controlan la excitabilidad neuronal intrínseca y la integración sináptica.

Entre los cambios sufridos a nivel celular durante el período de epileptogénesis se incluyen algunas canalopatías adquiridas. Se ha visto una disminución de la corriente tipo A durante el período de crisis recurrentes espontáneas en ratas tratadas con pilocarpina debido a canalopatías adquiridas en las que se observó una disminución de la expresión de los canales Kv4.2 (Bernard et al. 2004) o de la proteína de asociación KChIP2 (Monaghan et al. 2008). Esta disminución de la corriente tipo A produce un incremento de la excitabilidad dendrítica que aumenta la sensibilidad de las neuronas piramidales a la propagación de las entradas sinápticas hacia el soma, así como incrementa la amplitud de los PAs retropropagados desde el soma hacia las dendritas. También se han observado canalopatías caracterizadas por un incremento anormal de la expresión de los canales de calcio Cav3 en el período de crisis recurrentes en ratas tratadas con pilocarpina (Sanabria et al. 2001). Otra diana importante en el período de epileptogénesis son los canales HCN, importantes para el potencial de la membrana en reposo y para la resonancia-H dendrítica (Biel et al. 2009; Hu et al. 2009). Jung y colaboradores observaron una disminución en la expresión del canal HCN1 en el período de crisis recurrentes y una disminución de la corriente tipo H, provocando un aumento en la amplitud de las corrientes postsinápticas, así como un enlentecimiento de su fase de caída (Jung et al. 2007). Estos cambios provocaban un incremento de la sumación dendrítica y de la excitabilidad neuronal, y una disminución de la resonancia-H.

Los cambios en la expresión de los canales Kv4.2, HCN y Cav3 durante la epileptogénesis provocan alteraciones importantes en la excitabilidad intrínseca. También pueden fallar los mecanismos homeostáticos que contrarrestan los cambios de voltaje producidos por ciertas perturbaciones para estabilizar la actividad neuronal. Además, cambios en la excitabilidad

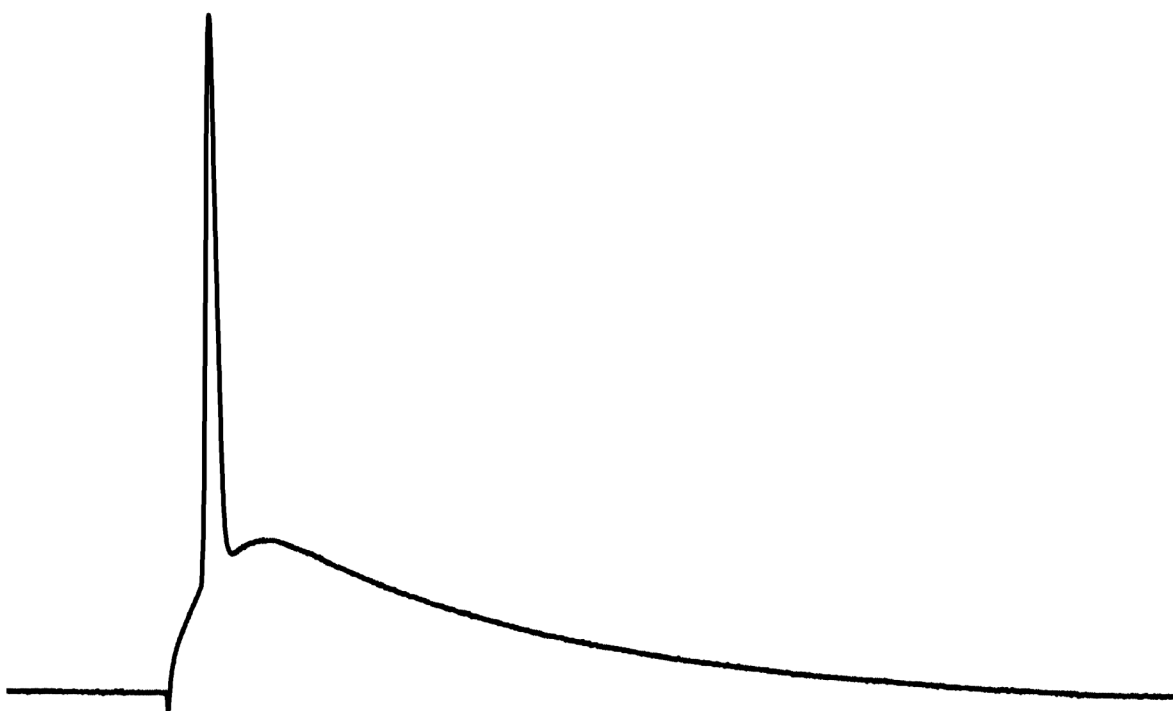
intrínseca que alteren la función entrada-salida de la neurona pueden afectar al comportamiento de la red y viceversa (Zhang & Linden 2003; Marder & Goaillard 2006). En ese aspecto, la plasticidad intrínseca descrita durante esta tesis podría verse alterada en patologías como la epilepsia, pues los cambios de expresión de los canales Kv4.2 y Cav3 podrían afectar a la expresión de complejos Cav3-Kv4.

Estas corrientes, activas a potenciales subumbrales, son fundamentales para determinar la precisión, el patrón y la frecuencia del disparo. La secuencia de las corrientes es fundamental para asegurar la precisión del disparo, pues si la corriente de salida se produce después de la de entrada, se acorta la duración del PEPS y reduce la ventana temporal en la que se puede generar el PA (Fricker et al. 1999; Vervaeke et al. 2006). La precisión temporal de disparo es importante en muchos procesos fisiológicos como la codificación de la información espacial (O'Keefe & Recce 1993) y algunas formas de plasticidad sináptica (Markram et al. 1997). En un hipocampo epiléptico, las células disparan de una forma imprecisa, provocando alteraciones en la coordinación espacial y temporal del disparo (Foffani et al. 2007). Además, la precisión de disparo reducida correlaciona con la generación de oscilaciones de alta frecuencia como se ha visto en ratas epilépticas de CA3 (Foffani et al. 2007). Recientemente, se ha descrito una disminución de la precisión en el acoplamiento PEPS-PA en el giro dentado de neuronas epilépticas (Epsztein et al. 2010), y se han visto déficits de aprendizaje relacionados con alteraciones en la organización temporal del disparo en el área CA1 de ratas epilépticas (Lenck-Santini & Holmes 2008).

Las neuronas inmaduras tienen una mayor resistencia de la membrana, las corrientes repolarizantes de inactivación lenta están poco desarrolladas y hay un déficit en los sistemas de control de la excitabilidad (como la regulación de la corriente tipo A por la corriente tipo T). Además, la precisión temporal de disparo es menor, dado que su mayor resistencia y constante de tiempo de la membrana producen unas cinéticas de caída del PEPS más lentas que en neuronas maduras (Cathala et al. 2003). Estas propiedades inmaduras podrían explicar la relativamente elevada incidencia de epilepsia infantil (Hauser 1992; Hauser 1994; Kurtz et al. 1998; Durá Travé et al. 2007).

Durante las crisis epilépticas se ha observado una disminución de la concentración extracelular de calcio (Heinemann et al. 1977). Experimentos *in vitro* en hipocampo disminuyendo la concentración extracelular de calcio (y por tanto disminuyendo los niveles de iones divalentes), mostraron un comportamiento similar al epiléptico, con oscilaciones de alta frecuencia patológicas (de mayor amplitud y con una frecuencia superior a 200 Hz) y un desequilibrio excitación-inhibición similar al descrito en animales epilépticos (Aivar et al. 2014).

CONCLUSIONES



Durante el desarrollo postnatal en las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo se producen cambios de las características electrofisiológicas básicas:

1. En las propiedades electrofisiológicas pasivas: el potencial de la membrana en reposo se hiperpolariza, aumenta la capacidad y disminuyen la resistencia y la constante de tiempo de la membrana.
2. En la morfología del potencial de acción: el umbral se hiperpolariza, disminuye la velocidad de repolarización y aumentan la amplitud, la duración media y la velocidad de despolarización.
3. Al comparar el décimo potencial de acción generado durante un tétanos con respecto al primero se observa una disminución de: la despolarización del umbral, el enlentecimiento de las velocidades de despolarización y repolarización, y el incremento de la duración media.
4. La participación de la corriente de potasio tipo A sobre la amplitud y la velocidad de despolarización del potencial de acción disminuye.
5. La excitabilidad intrínseca disminuye en función de sus propiedades pasivas, aumenta en función de sus propiedades activas, y aumenta la frecuencia máxima de disparo.

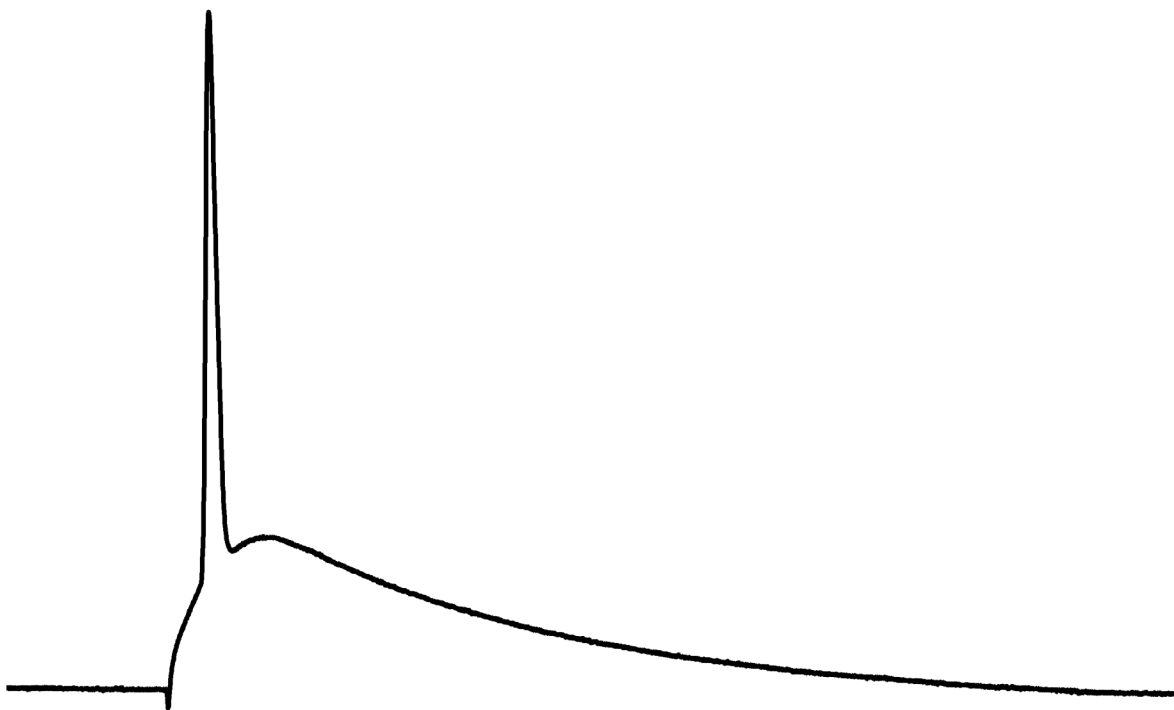
Durante el desarrollo postnatal en las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo se desarrolla una plasticidad intrínseca a corto plazo que se caracteriza por:

1. Aparece a partir de los 16 días de edad postnatal.
2. Es específica de las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo.
3. Aumenta la velocidad de repolarización y disminuye la duración media del potencial de acción.
4. Disminuye la excitabilidad intrínseca de la neurona.
5. La inducción requiere despolarizaciones de 15 segundos de duración como mínimo, y es máxima a partir de despolarizaciones de 5 minutos de duración.
6. La extinción requiere hiperpolarizaciones de 15 segundos de duración como mínimo, y es máxima a partir de hiperpolarizaciones de 5 minutos de duración.
7. Incrementa la corriente de potasio tipo A.
8. La inducción depende del calcio que entra por los canales Cav3.
9. El sensor de calcio encargado de la inducción es la proteína accesoria KChIP3, que modula los canales Kv4.2.
10. La relación Cav3.2/Kv4.2 aumenta con la edad en paralelo al desarrollo de la plasticidad.

La disminución en la concentración extracelular de calcio tiene los siguientes efectos sobre la excitabilidad de las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo:

1. No afecta a las propiedades pasivas de la membrana.
2. El umbral se hiperpolariza e incrementa la frecuencia de disparo al desplazar a la izquierda las curvas de activación e inactivación de los canales implicados en la corriente transitoria de sodio.
3. La velocidad de la segunda mitad de la fase repolarizante disminuye al no activarse los canales KCa1.1 implicados en la corriente tipo BK.
4. La generación de potenciales de acción ante estímulos de alta intensidad se bloquea debido al desplazamiento a la izquierda de la curva de inactivación de la corriente transitoria de sodio, y al no activarse los canales de potasio dependientes de calcio.
5. La amplitud y la duración media de la ADP disminuyen y provocan la aparición de un patrón de disparo regular. Dichos efectos están relacionados con la disminución de la corriente tipo T de calcio.

BIBLIOGRAFÍA



- Adelman, J.P., Maylie, J. & Sah, P., 2012. Small-Conductance Ca^{2+} -Activated K^+ Channels: Form and Function. *Annual Review of Physiology*, 74(1), pp.245–269.
- Adelman, W.J. & Moore, J.W., 1961. Action of external divalent ion reduction on sodium movement in the squid giant axon. *The Journal of general physiology*, 45, pp.93–103.
- Aivar, P., Valero, M., Bellistri, E. & Menéndez de la Prida, L., 2014. Extracellular calcium controls the expression of two different forms of ripple-like hippocampal oscillations. *The Journal of neuroscience*, 34(8), pp.2989–3004.
- Aizenman, C.D. & Linden, D.J., 2000. Rapid, synaptically driven increases in the intrinsic excitability of cerebellar deep nuclear neurons. *Nature neuroscience*, 3(2), pp.109–111.
- Aldrich, R.W., Getting, P.A. & Thompson, S.H., 1979. Mechanism of frequency-dependent broadening of molluscan neurone soma spikes. *The Journal of physiology*, 291, pp.531–544.
- Amendola, J., Woodhouse A., Martin-Eauclaire, M.F. & Goaillard, J.M., 2012. Ca^{2+} /cAMP-sensitive covariation of I(A) and I(H) voltage dependences tunes rebound firing in dopaminergic neurons. *The Journal of neuroscience*, 32(6), pp.2166–2181.
- An, W.F. et al., 2000. Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature*, 403(6769), pp.553–556.
- Andersen, P., Eccles, J.C. & Loynning, Y., 1964. Location of postsynaptic inhibitory synapses on hippocampal pyramids. *The Journal of Physiology*, 27, pp. 592-607.
- Anderson, D., Mehaffey, W.H., Iftinca, M., Rehak, R., Engbers, J.D.T., Hameed, S., Zamponi, G.W. & Turner, R.W., 2010. Regulation of neuronal activity by Cav3-Kv4 channel signaling complexes. *Nature neuroscience*, 13(3), pp.333–337.
- Anderson, D., Rehak, R., Hameed, S., Mehaffey, W.H., Zamponi, G.W. & Turner, R.W., 2010. Regulation of the Kv4.2 complex by Cav3.1 calcium channels. *Channels*, 4(3), pp.163–167.
- Anderson, D., Engbers, J.D.T., Heath, N.C., Bartoletti, T.M., Mehaffey, W.H., Zamponi & G.W., Turner, R.W., 2013. The Cav3-Kv4 complex acts as a calcium sensor to maintain inhibitory charge transfer during extracellular calcium fluctuations. *The Journal of neuroscience*, 33(18), pp.7811–7824.
- Anderson, J., Lampl, I., Reichov, I., Carandini, M. & Ferster, D., 2000. Stimulus dependence of two-state fluctuations of membrane potential in cat visual cortex. *Nature neuroscience*, 3, pp.617–621.
- Andrew, R. & Dudek, F., 1985. Spike Broadening in Magnocellular Neuro-Endocrine Cells of Rat Hypothalamic Slices. *Brain research*, 334, pp.176–179.
- Antonucci, D.E., Lim, S.T., Vassanelli, S. & Trimmer, J.S., 2001. Dynamic localization and clustering of dendritic Kv2.1 voltage-dependent potassium channels in developing hippocampal neurons. *Neuroscience*, 108(1), pp.69–81.

- Aoki, T. & Baraban, S.C., 2000. Properties of a Calcium-Activated K^+ Current on Interneurons in the Developing Rat Hippocampus. *Journal of neurophysiology*, 83, pp.3453–3461.
- Avery, R.B. & Johnston, D., 1996. Multiple Channel Types Contribute to the Low-Voltage-Activated Calcium Current in Hippocampal CA3 Pyramidal Neurons. *The Journal of neuroscience*, 16(18), pp.5567–5582.
- Axmacher, N. & Miles, R., 2004. Intrinsic cellular currents and the temporal precision of EPSP-action potential coupling in CA1 pyramidal cells. *The Journal of physiology*, 555(Pt 3), pp.713–725.
- Azouz, R., Jensen, M.S. & Yaari, Y., 1996. Ionic basis of spike after-depolarization and burst generation in adult rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *The Journal of physiology*, 492(1), pp.211–223.
- Bähring, R., Boland, L.M., Varghese, A., Gabauer, M. & Pongs, O., 2001. Kinetic analysis of open- and closed-state inactivation transitions in human Kv4.2 A-type potassium channels. *The Journal of physiology*, 535(Pt 1), pp.65–81.
- Baraban, S.C. & Schwartzkroin, P. A., 1995. Electrophysiology of CA1 pyramidal neurons in an animal model of neuronal migration disorders: prenatal methylazoxymethanol treatment. *Epilepsy Research*, 22(2), pp.145–156.
- Baraban, S.C. & Schwartzkroin, P.A., 1996. Effects of Prenatal Cocaine Exposure on the Developing Hippocampus: Intrinsic and Synaptic Physiology. *Journal of neurophysiology*, 77(1), pp.126–136.
- Baranauskas, G. & Martina, M., 2006. Sodium currents activate without a Hodgkin-and-Huxley-type delay in central mammalian neurons. *The Journal of neuroscience*, 26(2), pp.671–684.
- Bean, B.P., 2007. The action potential in mammalian central neurons. *Nature reviews. Neuroscience*, 8(6), pp.451–465.
- Bean, B.P. & McDonough, S.I., 1998. Two for T. *Neuron*, 20, pp.825–828.
- Beck, H. & Yaari, Y., 2008. Plasticity of intrinsic neuronal properties in CNS disorders. *Nature reviews. Neuroscience*, 9(5), pp.357–369.
- Bekkers, J.M. & Delaney, a J., 2001. Modulation of excitability by alpha-dendrotoxin-sensitive potassium channels in neocortical pyramidal neurons. *The Journal of neuroscience*, 21(17), pp.6553–6560.
- Bender, K.J., Ford, C.P. & Trussell, L.O., 2010. Dopaminergic modulation of axon initial segment calcium channels regulates action potential initiation. *Neuron*, 68(3), pp.500–511.
- Bender, K.J. & Trussell, L.O., 2009. Axon initial segment Ca^{2+} channels influence action potential generation and timing. *Neuron*, 61(2), pp.259–271.
- Berkefeld, H. et al., 2006. BK_{Ca} -Cav channel complexes mediate rapid and located Ca^{2+} -activated K^+ signaling. *Science*, 314, pp.615–621.

- Berkefeld, H. & Fakler, B., 2013. Ligand-gating by Ca^{2+} is rate limiting for physiological operation of BK(Ca) channels. *The Journal of neuroscience*, 33(17), pp.7358–7367.
- Berkefeld, H., Fakler, B. & Schulte, U., 2010. Ca^{2+} -activated K^+ channels: from protein complexes to function. *Physiological reviews*, 90(4), pp.1437–1459.
- Bernard, C., Anderson, A., Becker, A., Poolos, N.P., Beck, H. & Johnston, D., 2004. Acquired dendritic channelopathy in temporal lobe epilepsy. *Science*, 305(5683), pp.532–535.
- Bernstein, J., 1912. *Elektrobiologie: Die Lehre von den elektrischen Vorgängen im Organismus auf moderner Grundlage dargestellt*. Vieweg, ed., Braunschweig.
- Bernstein, J., 1902. Untersuchungen zur thermodynamik der bioelektrischen ströme. Erstet Theil. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 92, pp.521–562.
- Biel, M., Wahl-Schott, C., Michalakakis, S. & Zong, X., 2009. Hyperpolarization-Activated Cation Channels : From Genes to Function. *Physiological reviews*, 89, pp.847–885.
- Bikson, M., Baraban, S.C. & Durand, D.M., 2002. Conditions sufficient for nonsynaptic epileptogenesis in the CA1 region of hippocampal slices. *Journal of neurophysiology*, 87(1), pp.62–71.
- Biscoe, T.J. & Duchen, M.R., 1985. An intracellular study of dentate, CA1 and CA3 neurones in the mouse hippocampal slice. *Quarterly journal of experimental physiology*, 70, pp.189–202.
- Blanton, M.G., Lo Turco, J.J. & Kriegstein, A.R., 1989. Whole Cell Recording from Neurons in Slices of Reptilian and Mammalian Cerebral-Cortex. *Journal of Neuroscience Methods*, 30(3), pp.203–210.
- Boiko, T., Rasband, M.N., Levinson, S.R., Caldwell, J.H., Mandel, G., Trimmer, J.S. & Matthews, G., 2001. Compact Myelin Dictates the Differential Targeting of Two Sodium Channel Isoforms in the Same Axon. *Neuron*, 30, pp.91–104.
- Boiko, T., Van Wart, A., Caldwell, J.H., Levinson, S.R., Trimmer, J.S. & Matthews, G., 2003. Functional Specialization of the Axon Initial Segment by Isoform-Specific Sodium Channel Targeting. *The Journal of neuroscience*, 23(6), pp.2306–2313.
- Bossu, J., Capogna, M., Debanne, D., McKinney, R.A. & Gähwiler, B.H., 1996. Somatic voltage-gated potassium currents of rat hippocampal pyramidal cells in organotypic slice cultures. *The Journal of physiology*, 495(2), pp.367–381.
- Bostock, H., 1983. The strength-duration relationship for excitation of myelinated nerve: Computed dependence on membrane parameters. *The Journal of physiology*, 341, pp.59–74.
- Bourdeau, M.L., Laplante, I., Laurent, C.E., Lacaille, J.C., 2011. KChIP1 modulation of Kv4.3-mediated A-type K^+ currents and repetitive firing in hippocampal interneurons. *Neuroscience*, 176, pp.173–187.

- Brickley, S.G., Revilla, V., Cull-Candy, S.G., Wisden, W. & Farrant, M., 2001. Adaptive regulation of neuronal excitability by a voltage-independent potassium conductance. *Nature*, 409(6816), pp.88–92.
- Brown, D. A & Passmore, G.M., 2009. Neural KCNQ (Kv7) channels. *British journal of pharmacology*, 156(8), pp.1185–1195.
- Brown, D.A. & Adams, P.R., 1980. Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K⁺ current in a vertebrate neurone. *Nature*, 283(5748), pp.673–676.
- Brown, J.T. & Randall, A.D., 2009. Activity-dependent depression of the spike after-depolarization generates long-lasting intrinsic plasticity in hippocampal CA3 pyramidal neurons. *The Journal of physiology*, 587(Pt 6), pp.1265–1281.
- Brown, J.T., Chin, J., Leiser, S.C., Menelas, N.P. & Randall, A.D., 2011. Altered intrinsic neuronal excitability and reduced Na⁺ currents in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 2109, pp. e1-e14.
- Brumberg, J.C., Nowak, L.G. & McCormick, D.A., 2000. Ionic mechanisms underlying repetitive high-frequency burst firing in supragranular cortical neurons. *The Journal of neuroscience*, 20, pp.4829–4843.
- Buzsáki, G., 1989. Two-stage model of memory trace formation: a role for “noisy” brain states. *Neuroscience*, 31(3), pp.551–570.
- Buzsáki, G., Horvath, Z. & Urioste, R., 1992. High-frequency network oscillation in the hippocampus. *Science*, 256(5059), pp.1025–1027.
- Campanac, E., Gasselín, C., Baude, A., Rama, S., Ankri, N. & Debanne, D., 2013. Enhanced intrinsic excitability in basket cells maintains excitatory-inhibitory balance in hippocampal circuits. *Neuron*, 77(4), pp.712–722.
- Campanac, E. & Debanne, D., 2008. Spike timing-dependent plasticity: a learning rule for dendritic integration in rat CA1 pyramidal neurons. *The Journal of physiology*, 586(3), pp.779–793.
- Caporale, N. & Dan, Y., 2008. Spike timing-dependent plasticity: a Hebbian learning rule. *Annual review of neuroscience*, 31, pp.25–46.
- Carter, B.C., Giessel, A.J., Sabatini, B.L. & Bean, B.P., 2012. Transient sodium current at subthreshold voltages: activation by EPSP waveforms. *Neuron*, 75(6), pp.1081–1093.
- Caspi, A., Benninger, F. & Yaari, Y., 2009. KV7/M channels mediate osmotic modulation of intrinsic neuronal excitability. *The Journal of neuroscience*, 29(36), pp.11098–11111.
- Castellucci, V.F., Nairn, A., Greengard, P., Schwartz, J.H. & Kandel, E.R., 1982. Inhibitor of Adenosine 3'-5'-Monophosphate-Dependent Protein-Kinase Blocks Pre-Synaptic Facilitation in Aplysia. *The Journal of neuroscience*, 2, pp.1673–1681.

- Cathala, L., Brickley, S., Cull-Candy, S.G. & Farrant, M., 2003. Maturation of EPSCs and intrinsic membrane properties enhances precision at a cerebellar synapse. *The Journal of neuroscience*, 23, pp.6074–6085.
- Cattaneo, A., Maffei, L. & Morrone, C., 1981. Two firing patterns in the discharge of complex cells encoding different attributes of the visual stimulus. *Experimental brain research*, 43, pp.115–118.
- Chen, S. et al., 2011. An increase in persistent sodium current contributes to intrinsic neuronal bursting after status epilepticus. *Journal of neurophysiology*, 105(1), pp.117–129.
- Chen, S., Benninger, F. & Yaari, Y., 2014. Role of small conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels in controlling CA1 pyramidal cell excitability. *The Journal of neuroscience*, 34(24), pp.8219–8230.
- Chen, S. & Yaari, Y., 2008. Spike Ca^{2+} influx upmodulates the spike afterdepolarization and bursting via intracellular inhibition of KV7/M channels. *The Journal of physiology*, 586(5), pp.1351–1363.
- Chen, S., Yue, C. & Yaari, Y., 2005. A transitional period of Ca^{2+} -dependent spike afterdepolarization and bursting in developing rat CA1 pyramidal cells. *The Journal of physiology*, 567(Pt 1), pp.79–93.
- Chen, W., Zhang, J.J., Hu, G.Y., Wu, C.P., 1996. Different mechanisms underlying the repolarization of narrow and wide action potentials in pyramidal cells and interneurons of cat motor cortex. *Neuroscience*, 73(1), pp.57–68.
- Cheong, E. et al., 2008. Tuning Thalamic Firing Modes via Simultaneous Modulation of T- and L-Type Ca^{2+} Channels Controls Pain Sensory Gating in the Thalamus. *The Journal of Neuroscience*, 28(49), pp.13331–13340.
- Cohen, I., Navarro, V., Clemenceau, S., Baulac, M. & Miles, R., 2002. On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. *Science*, 298(5597), pp.1418–1421.
- Colbert, C.M., Magee, J.C., Hoffman, D.A. & Johnston, D., 1997. Slow recovery from inactivation of Na^+ channels underlies the activity-dependent attenuation of dendritic action potentials in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *The Journal of neuroscience*, 17(17), pp.6512–6521.
- Coleman, P.A. & Miller, R.F., 1989. Measurement of passive membrane parameters with whole-cell recording from neurons in the intact amphibian retina. *Journal of neurophysiology*, 61(1), pp.218–230.
- Collin, C., Papageorge, A.G., Lowy, D.R. & Alkon, D.L., 1990. Early Enhancement of Calcium Currents by H-Ras Oncoproteins Injected Into Hermisenda Neurons. *Science*, 250(4988), pp.1743–1745.
- Connor, J. & Stevens, C.F., 1971a. Voltage clamp studies of a transient outward membrane current in gastropod neural somata. *The Journal of physiology*, 213, pp.21–30.

- Connor, J. & Stevens, C.F., 1971b. Prediction of repetitive firing behaviour from voltage clamp data on an isolated neurone soma. *The Journal of physiology*, 213, pp.31–53.
- Connors, B.W., Gutnick, M.J. & Prince, D.A., 1982. Electrophysiological Properties of Neocortical Neurons in Vitro. *Journal of neurophysiology*, 48(6), pp.1302–1320.
- Costa, P.F., 1996. The kinetic parameters of sodium currents in maturing acutely isolated rat hippocampal CA1 neurones. *Developmental Brain Research*, 91, pp.29–40.
- Costa, P.F., Ribeiro, M.A. & Santos, A.I., 1991. Afterpotential characteristics and firing patterns in maturing rat hippocampal CA1 neurones in in vitro slices. *Developmental Brain Research*, 62, pp.263–272.
- Costa, P.F., Santos, A.I. & Ribeiro, M.A., 1994. Potassium currents in acutely isolated maturing rat hippocampal CA1 neurones. *Developmental Brain Research*, 83, pp.216–223.
- Craig, P.J. et al., 1999. Distribution of the voltage-dependent calcium channel α_1G subunit mRNA and protein throughout the mature rat brain. *European Journal of Neuroscience*, 11(8), pp.2949–2964.
- Crandall, S.R., Govindaiah, G. & Cox, C.L., 2010. Low-threshold Ca^{2+} current amplifies distal dendritic signaling in thalamic reticular neurons. *The Journal of neuroscience*, 30(46), pp.15419–15429.
- Crépel, V., Krnjevic, K. & Ben-Ari, Y., 1993. Sulphonylureas reduce the slowly inactivating D-type outward current in rat hippocampal neurons. *The Journal of physiology*, 466, pp.39–54.
- Cudmore, R.H., Fronzaroli-Molinieres, L., Giraud, P. & Debanne, D., 2010. Spike-time precision and network synchrony are controlled by the homeostatic regulation of the D-type potassium current. *The Journal of neuroscience*, 30(38), pp.12885–12895.
- Cudmore, R.H. & Turrigiano, G.G., 2004. Long-term potentiation of intrinsic excitability in LV visual cortical neurons. *Journal of neurophysiology*, 92(1), pp.341–348.
- Daoudal, G. & Debanne, D., 2003. Long-term plasticity of intrinsic excitability: learning rules and mechanisms. *Learning & memory*, 10(6), pp.456–465.
- Debanne, D., 1996. Associative synaptic plasticity in hippocampus and visual cortex: cellular mechanisms and functional implications. *Reviews in neuroscience*, 7(1), pp.29–46.
- Debanne, D., Daoudal, G., Sourdret, V. & Russier, M., 2003. Brain plasticity and ion channels. *Journal of physiology, Paris*, 97, pp.403–414.
- Debanne, D., Gähwiler, B.H. & Thompson, S.M., 1998. Long-term synaptic plasticity between pairs of individual CA3 pyramidal cells in rat hippocampal slice cultures. *The Journal of physiology*, 507(1), pp.237–247.
- Delmas, P. & Brown, D. A., 2005. Pathways modulating neural KCNQ/M (Kv7) potassium channels. *Nature reviews. Neuroscience*, 6(11), pp.850–862.

- Desai, N.S., 2003. Homeostatic plasticity in the CNS: synaptic and intrinsic forms. *Journal of physiology, Paris*, 97(4-6), pp.391–402.
- Desai, N.S., Rutherford, L.C. & Turrigiano, G.G., 1999. Plasticity in the intrinsic excitability of cortical pyramidal neurons. *Nature neuroscience*, 2(6), pp.515–520.
- Disterhoft, J.F., Thompson, L.T., Moyer, J.R. & Mogui, D. 1996. Calcium-dependent afterhyperpolarization and learning in young and aging hippocampus. *Life sciences*, 59, pp.413–420.
- Dodge, F.A. & Cooley, J.W., 1973. Action potential of the motoneuron. *IBM Journal of research development*, 17, pp.219–229.
- Du, J., Zhang, L., Weiser, M., Rudy, B. & McBain, C.J., 1996. Developmental Expression and Functional Characterization Subunit Kv3.1b in Parvalbumin-Containing Interneurons of the Rat Hippocampus. *The Journal of neuroscience*, 16(2), pp.506–518.
- Du, J., Haak, L.L., Phillips-Tansey, E., Russell, J.T. & McBain, C.J., 2000. Frequency-dependent regulation of rat hippocampal somato-dendritic excitability by the K⁺ channel subunit Kv2.1. *The Journal of Physiology*, 522(1), pp.19–31.
- Du Boys-Reymond, E., 1887. *Gesammelte abhandlungen zur allgemeinen muskel- und nervenphysik* von V. Verlag, ed., Leipzig.
- Dudek, S.M. & Bear, M.F., 1992. Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, pp.4363–4367.
- Durá Travé, T., Yoldi Petri, M.E. & Gallinas Victoriano, F., 2007. Incidencia de la epilepsia infantil. *Anales de Pediatría*, 67(1), pp.37–43.
- Eichenbaum, H., 2004. Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron*, 44, pp 109-120.
- Elinder, F., Madeja, M. & Arhem, P., 1996. Surface Charges of K channels. Effects of strontium on five cloned channels expressed in *Xenopus* oocytes. *The Journal of general physiology*, 108(4), pp.325-332.
- Engbers, J.D.T. et al., 2012. Intermediate conductance calcium-activated potassium channels modulate summation of parallel fiber input in cerebellar Purkinje cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(7), pp.2601–2606.
- Engbers, J.D.T., Zamponi, G.W. & Turner, R.W., 2013. Modeling interactions between voltage-gated Ca²⁺ channels and KCa1.1 channels. , 7(6), pp.524–529.
- Epsztein, J., Sola, E., Represa, A., Ben-Ari, Y. & Crépel, V., 2010. A selective interplay between aberrant EPSP_{KA} and I_{NaP} reduces spike timing precision in dentate granule cells of epileptic rats. *Cerebral cortex*, 20(4), pp.898–911.

- Faber, E.S.L. & Sah, P., 2003. Ca^{2+} -activated K^+ (BK) channel inactivation contributes to spike broadening during repetitive firing in the rat lateral amygdala. *The Journal of physiology*, 552(Pt 2), pp.483–497.
- Fagan, M. & Andrew, R., 1991. Intracellular Study of Calcium-Related Events in Cat Magnocellular Neuroendocrine Cells. *The Journal of physiology*, 434, pp.337–349.
- Fakler, B. & Adelman, J.P., 2008. Control of K_{Ca} channels by calcium nano/microdomains. *Neuron*, 59(6), pp.873–881.
- Fan, Y., Fricker, D., Brager, D.H., Chen, X., Lu, H.C., Chitwood, R.A. & Johnston, D., 2005. Activity-dependent decrease of excitability in rat hippocampal neurons through increases in I_{h} . *Nature neuroscience*, 8(11), pp.1542–1551.
- Feng, Z. & Durand, D., 2003. Low-calcium epileptiform activity in the hippocampus *in vivo*. *Journal of neurophysiology*, 90, pp.2253–2260.
- Ficker, E. & Heinemann, U., 1992. Slow and fast transient potassium currents in cultured rat hippocampal cells. *The Journal of physiology*, 445, pp.431–455.
- Foffani, G., Uzategui, Y.G., Gal, B. & Menéndez de la Prida, L., 2007. Reduced spike-timing reliability correlates with the emergence of fast ripples in the rat epileptic hippocampus. *Neuron*, 55(6), pp.930–941.
- Frankenhauser, B. & Hodgkin, A.L., 1957. The action of calcium on the electrical properties of squid axons. *The Journal of physiology*, 137, pp.218–244.
- Franklin, J.L., Fickbohm, D.J. & Willard, A.L., 1992. Long-term regulation of neuronal calcium currents by prolonged changes of membrane potential. *The Journal of neuroscience*, 12(5), pp.1726–1735.
- Frick, A. & Johnston, D., 2005. Plasticity of dendritic excitability. *Journal of neurobiology*, 64(1), pp.100–115.
- Frick, A., Magee, J. & Johnston, D., 2004. LTP is accompanied by an enhanced local excitability of pyramidal neuron dendrites. *Nature neuroscience*, 7(2), pp.126–135.
- Fricker, D., Verheugen, J.A.H. & Miles, R., 1999. Cell-attached measurements of the firing threshold of rat hippocampal neurones. *The Journal of physiology*, 517(Pt 3), pp.791–804.
- Frotscher, M. & Seress, L., 2007. Morphological development of the hippocampus. In *The hippocampus book*. pp. 115–131.
- Fujisawa, S., Matsuki, N. & Ikegaya, Y., 2006. Single neurons can induce phase transitions of cortical recurrent networks with multiple internal states. *Cerebral cortex*, 16, pp.639–654.
- Fukuda, A. & Prince, D.A., 1992. Postnatal development of electrogenic sodium pump activity in rat hippocampal pyramidal neurons. *Brain research. Developmental brain research*, 65(1), pp.101–114.

- Gasparini, S., Losonczy, A., Chen, X., Johnston, D. & Magee, J.C., 2007. Associative pairing enhances action potential back-propagation in radial oblique branches of CA1 pyramidal neurons. *The Journal of physiology*, 580(Pt.3), pp.787–800.
- Geiger, R.P. & Jonas, P., 2000. Dynamic Control of Presynaptic Ca^{2+} Inflow by Fast-Inactivating K^+ Channels in Hippocampal Mossy Fiber Boutons. *Neuron*, 28, pp.927–939.
- Giese, K.P. et al., 1998. Reduced K^+ Channel Inactivation, Spike Broadening, and After-Hyperpolarization in Kv1.1-Deficient Mice with Impaired Learning. *Learning & Memory*, 5, pp.257–273.
- Giglio, A.M. & Storm, J.F., 2014. Postnatal development of temporal integration, spike timing and spike threshold regulation by a dendrotoxin-sensitive K^+ current in rat CA1 hippocampal cells. *The European journal of neuroscience*, 39(1), pp.12–23.
- Gilly, W.F. & Armstrong, C.M., 1982a. Slowing of sodium channel opening kinetics in squid axon by extracellular zinc. *The Journal of general physiology*, 79(6), pp.935–964.
- Gilly, W.F. & Armstrong, C.M., 1982b. Divalent cations and the activation kinetics of potassium channels in squid giant axons. *The Journal of general physiology*, 79(6), pp.965–996.
- Gittis, A.H., Moghadam, S.H. & du Lac, S., 2010. Mechanisms of sustained high firing rates in two classes of vestibular nucleus neurons: differential contributions of resurgent Na, Kv3, and BK currents. *Journal of neurophysiology*, 104(3), pp.1625–1634.
- Glynn, I., 2002. A hundred years of sodium pumping. *Annual review of physiology*, 64, pp.1–18.
- Golding, N.L. & Spruston, N., 1998. Dendritic sodium spikes are variable triggers of axonal action potentials in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neuron*, 21(5), pp.1189–1200.
- Gong, B., Liu, M. & Qi, Z., 2008. Membrane Potential Dependent Duration of Action Potentials in Cultured Rat Hippocampal Neurons. *Cellular and molecular neurobiology*, 28, pp.49–56.
- Graef, J.D., Nordskog, B.K., Wiggins, W.F. & Godwin, D.W. 2009. An Acquired Channelopathy Involving Thalamic T-Type Ca^{2+} Channels after Status Epilepticus. *Journal of Neuroscience*, 29(14), pp.4430–4441.
- Graves, A.R., Moore, S.J., Bloss, E.B., Mensh, B.D., Kath, W.L. & Spruston, N. 2012. Hippocampal pyramidal neurons comprise two distinct cell types that are countermodulated by metabotropic receptors. *Neuron*, 76(4), pp.776–789.
- Groc, L., Gustafsson, B. & Hanse, E., 2003. Early establishment of multiple release site connectivity between interneurons and pyramidal neurons in the developing hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, 17(9), pp.1873–1880.
- Grubb, M.S. & Burrone, J., 2010. Activity-dependent relocation of the axon initial segment fine-tunes neuronal excitability. *Nature*, 465(7301), pp.1070–1074.
- Gu, C. & Barry, J., 2011. Function and mechanism of axonal targeting of voltage-sensitive potassium channels. *Progress in neurobiology*, 94(2), pp.115–132.

- Gu, N., Vervaeke, K. & Storm, J.F., 2007. BK potassium channels facilitate high-frequency firing and cause early spike frequency adaptation in rat CA1 hippocampal pyramidal cells. *The Journal of physiology*, 580(Pt.3), pp.859–882.
- Guan, D., Horton, L.R., Armstrong, W.E. & Foehring, R.C., 2011. Postnatal development of A-type and Kv1- and Kv2-mediated potassium channel currents in neocortical pyramidal neurons. *Journal of neurophysiology*, 105(6), pp.2976–2988.
- Gutman, G.A et al., 2005. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacological reviews*, 57(4), pp.473–508.
- Hall, A.M. et al., 2015. Tau-dependent Kv4.2 depletion and dendritic hyperexcitability in a mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience*, 35(15):6221–6230.
- Hahn, R. & Campbell, D.T., 1983. Simple Shifts in the Voltage Dependence of Sodium Channel Gating Caused by Divalent Cations. *The Journal of general physiology*, 82, pp.785–805.
- Hammond, R.S., Lin, L., Sidorov, M.S., Wikenheiser, A.M. & Hoffman, D.A. 2008. Protein kinase A mediates activity-dependent Kv4.2 channel trafficking. *The Journal of neuroscience*, 28(30), pp.7513–7519.
- Harris, K.D., Hirase, H., Leinekugel, X., Henze, D.A & Buzsáki, G., 2001. Temporal Interaction between Single Spikes and Complex Spike Bursts in Hippocampal Pyramidal Cells. *Neuron*, 32(1), pp.141–149.
- Hauser, W., 1992. Seizure disorders: the changes with age. *Epilepsia*, 33(Suppl 4), pp.S6–S14.
- Hauser, W., 1994. The prevalence and incidence of convulsive disorders in children. *Epilepsia*, 35(Suppl 2), pp.S1–S6.
- Häusser, M., Spruston, N. & Stuart, G.J., 2000. Diversity and dynamics of dendritic signalling. *Science*, 290, pp.739–744.
- He, S., Wang, Y.X., Petralia, R.S. & Brenowitz, S.D., 2014. Cholinergic Modulation of Large-Conductance Calcium-Activated Potassium Channels Regulates Synaptic Strength and Spine Calcium in Cartwheel Cells of the Dorsal Cochlear Nucleus. *Journal of Neuroscience*, 34(15), pp.5261–5272.
- Heath, N.C. Rizwan, A.P., Engbers, J.D.T., Anderson, D., Zamponi, G.W. & Turner, R.W., 2014. The Expression Pattern of a Cav3-Kv4 Complex Differentially Regulates Spike Output in Cerebellar Granule Cells. *The Journal of neuroscience*, 34(26), pp.8800–8812.
- Heinemann, U., Lux, H. & Gutnick, M.J., 1977. Extracellular free calcium and potassium during paroxysmal activity in the cerebral cortex of the cat. *Experimental brain research*, 27(3-4), pp.237–243.
- Heyward, P., Ennis, M., Keller, A. & Shipley, M.T., 2001. Membrane bistability in olfactory bulb mitral cells. *The Journal of neuroscience*, (21), pp.5311–5320.

- Hill, A. V., 1936. Excitation and accommodation in nerve. *Proceedings of the Royal Society B*, 119, pp.305–355.
- Hille, B., 1968. Charges and potentials at the nerve surface. Divalent ions and pH. *The Journal of general physiology*, 51(2), pp.221–236.
- Hille, B., 2001. *Ion channels of excitable membranes* 3ª edición., Sunderland, Masschusetts, USA: Sinauer Associates, Inc.
- Hodgkin, A.L. & Huxley, A., 1939. Action potential recorded from inside a nerve fibre. *Nature*, 144, pp.710–711.
- Hodgkin, A.L. & Huxley, A., 1945. Resting and Action Potentials in Single Nerve Fibres. *The Journal of physiology*, 104, pp.176–195.
- Hodgkin, A.L. & Huxley, A., 1952a. Currents Carried by Sodium and Potassium Ions Through the Membrane of the Giant Axon of Loligo. *The Journal of physiology*, 116, pp.449–472.
- Hodgkin, A.L. & Huxley, A., 1952b. The Components of Membrane Conductance in the Giant Axon of Loligo. *The Journal of physiology*, 116, pp.473–496.
- Hodgkin, A.L. & Huxley, A., 1952c. The Dual Effect of Membrane Potential on Sodium Conductance in the Giant Axon of Loligo. *The Journal of physiology*, 116, pp.497–506.
- Hoffman, D.A., Magee, J.C., Colbert, C.M. & Johnston, D., 1997. K⁺ channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature*, 387(6636), pp.869–875.
- Hoffman, D.A. & Johnston, D., 1998. Downregulation of transient K⁺ channels in dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons by activation of PKA and PKC. *The Journal of neuroscience*, 18(10), pp.3521–3528.
- Holmqvist, M.H. et al., 2002. Elimination of fast inactivation in Kv4 A-type potassium channels by an auxiliary subunit domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(2), pp.1035–1040.
- Hsia, A., Malenka, R.C. & Nicoll, R.A., 1998. Development of excitatory circuitry in the hippocampus. *Journal of neurophysiology*, 79(4), pp.2013–2024.
- Hu, H., Vervaeke, K., Graham, L.J. & Storm, J.F., 2009. Complementary theta resonance filtering by two spatially segregated mechanisms in CA1 hippocampal pyramidal neurons. *The Journal of neuroscience*, 29(46), pp.14472–14483.
- Hu, H., Vervaeke, K. & Storm, J.F., 2002. Two forms of electrical resonance at theta frequencies, generated by M-current, h-current and persistent Na⁺ current in rat hippocampal pyramidal cells. *The Journal of Physiology*, 545(3), pp.783–805.
- Huguenard, R., Hamill, P. & Prince, A., 1988. Developmental Changes in Na⁺ Conductances in Rat Neocortical Neurons: Appearance of a Slowly Inactivating Component. *Journal of neurophysiology*, 59(3), pp.778–795.

- Hyun, J.H., Eom, K., Lee, K.H., Ho, W.K., & Lee, S.H., 2013. Activity-dependent downregulation of D-type K⁺ channel subunit Kv1.2 in rat hippocampal CA3 pyramidal neurons. *The Journal of Physiology*, 591(22), pp.5525–5540.
- Hyun, J.H et al., 2015. Kv1.2 mediates heterosynaptic modulation of direct cortical synaptic inputs in CA3 pyramidal cells. *The Journal of Physiology*, 593(16), pp.3617–3643.
- Iftinca, M.C. & Zamponi, G.W., 2009. Regulation of neuronal T-type calcium channels. *Trends in pharmacological sciences*, 30(1), pp.32–40.
- Ikemoto, Y., Ono, K., Yoshida, A. & Akaike, N. 1989. Delayed activation of large-conductance Ca²⁺-activated K channels in hippocampal neurons of the rat. *Biophysical journal*, 56, pp.207–212.
- Isaev, D. et al., 2007. Role of extracellular sialic acid in regulation of neuronal and network excitability in the rat hippocampus. *The Journal of neuroscience*, 27, pp.11587–11594.
- Isaev, D. et al., 2012. Surface charge impact in low-magnesium model of seizure in rat hippocampus. *Journal of Neurophysiology*, 107(1), pp.417–423.
- Isagai, T., Fujimura, E., Tanaka, E., Yamamoto, S. & Higashi, H. 1999. Membrane dysfunction induced by *in vitro* ischemia in immature rat hippocampal CA1 neurons. *Journal of Neurophysiology*, 81(4), pp.1866–1871.
- Izhikevich, E., Desai, N., Walcott, E. & Hoppensteadt, F.C., 2003. Burst as unit of neural information: selective communication via resonance. *Trends in neurosciences*, 26, pp.161–167.
- Jackson, A.C. & Bean, B.P., 2007. State-dependent enhancement of subthreshold A-type potassium current by 4-aminopyridine in tuberomammillary nucleus neurons. *The Journal of neuroscience*, 27(40), pp.10785–10796.
- Jarsky, T.I.M., Mady, R., Kennedy, B. & Spruston, N., 2008. Distribution of Bursting Neurons in the CA1 Region and the Subiculum of the Rat Hippocampus. *The journal of comparative neurology*, 506, pp.535–547.
- Jensen, M.S., Azouz, R. & Yaari, Y., 1996. Spike after-depolarization and burst generation in adult rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *The Journal of physiology*, 492(1), pp.199–210.
- Johnston, D., Hoffman, D.A., Colbert, C.M. & Magee, J.C., 1999. Regulation of back-propagating action potentials in hippocampal neurons. *Current opinion in neurobiology*, 9, pp.288–292.
- Johnston, D., Hoffman, D.A., Magee, J.C., Poolos, N.P., Watanabe, S., Colbert, C.M. & Migliore, M., 2000. Dendritic potassium channels in hippocampal pyramidal neurons. *The Journal of physiology*, 525(1), pp.75–81.
- Johnston, D., Hoffman, D.A. & Poolos, N.P., 2000. Potassium channels and dendritic function in hippocampal pyramidal neurons. *Epilepsia*, 41(8), pp.1072–1073.

- Johnston, J., Forsythe, I.D. & Kopp-Scheinflug, C., 2010. Going native: voltage-gated potassium channels controlling neuronal excitability. *The Journal of physiology*, 588(Pt 17), pp.3187–3200.
- Jung, H., Staff, N.P. & Spruston, N., 2001. Action Potential Bursting in Subicular Pyramidal Neurons Is Driven by a Calcium Tail Current. , 21(10), pp.3312–3321.
- Jung, S. et al., 2007. Progressive Dendritic HCN Channelopathy during Epileptogenesis in the Rat Pilocarpine Model of Epilepsy. *The Journal of Neuroscience*, 27(47), pp.13012–13021.
- Jung, S.C. & Hoffman, D.A., 2009. Biphasic somatic A-type K channel downregulation mediates intrinsic plasticity in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *PloS one*, 4(8), p.e6549.
- Kandel, E.R. & Spencer, W.A., 1961. Electrophysiology of hippocampal neurons. II. After-potentials and repetitive firing. *Journal of neurophysiology*, 24, pp.243–259.
- Kang, J., Huguenard, J.R. & Prince, D.A., 1996a. Development of BK Channels in Neocortical Pyramidal Neurons. *Journal of neurophysiology*, 76(1), pp.188–198.
- Kang, J., Huguenard, J.R. & Prince, D.A., 1996b. Two Types of BK Channels in Immature Rat Neocortical Pyramidal Neurons. *Journal of neurophysiology*, 76(6), pp.4194–4197.
- Katz, B. & Miledi, R., 1968. The role of calcium in neuromuscular facilitation. *The Journal of physiology*, 195, pp.481–492.
- Kay, A.R. & Wong, R.K.S., 1986. Isolation of neurons suitable for patch-clamping from adult mammalian central nervous systems. *Journal of Neuroscience Methods*, 16, pp.227–238.
- Kepecs, A., Wang, X. & Lisman, J., 2002. Bursting Neurons Signal Input Slope. *The Journal of neuroscience*, 22(20), pp.9053–9062.
- Kessels, H.W. & Malinow, R., 2009. Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior. *Neuron*, 61(3), pp.340–350.
- Kim, J., Jun, S.C., Clemens, A.M., Petralia, R.S. & Hoffman, D.A., 2007. Regulation of dendritic excitability by activity-dependent trafficking of the A-type K⁺ channel subunit Kv4.2 in hippocampal neurons. *Neuron*, 54(6), pp.933–947.
- Kim, J., Wei, D.S. & Hoffman, D.A., 2005. Kv4 potassium channel subunits control action potential repolarization and frequency-dependent broadening in rat hippocampal CA1 pyramidal neurones. *The Journal of physiology*, 569(Pt 1), pp.41–57.
- Kim, S., 2014. Action potential modulation in CA1 pyramidal neuron axons facilitates OLM interneuron activation in recurrent inhibitory microcircuits of rat hippocampus. *PloS one*, 9(11), pp.e113–124.
- Kirchheim, F., Tinnes, S., Haas, C.A., Stegen, M. & Wolfrt, J., 2013. Regulation of action potential delays via voltage-gated potassium Kv1.1 channels in dentate granule cells during hippocampal epilepsy. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7(December), p.248.

- Kirov, S.A, Sorra, K.E. & Harris, K.M., 1999. Slices have more synapses than perfusion-fixed hippocampus from both young and mature rats. *The Journal of neuroscience*, 19(8), pp.2876–2886.
- Klee, R., Ficker, E. & Heinemann, U., 1995. Comparison of voltage-dependent potassium currents in rat pyramidal neurons acutely isolated from hippocampal regions CA1 and CA3. *Journal of neurophysiology*, 74(5), pp.1982–1995.
- Knierim, J.J., Lee, I. & Hargreaves, E.L., 2006. Hippocampal place cells: parallel input streams, subregional processing, and implications for episodic memory. *Hippocampus*, 16, pp. 755–764.
- Kole, M.H.P., Letzkus, J.J. & Stuart, G.J., 2007. Axon initial segment Kv1 channels control axonal action potential waveform and synaptic efficacy. *Neuron*, 55(4), pp.633–47.
- Kole, M.H.P. & Stuart, G.J., 2008. Is action potential threshold lowest in the axon? *Nature neuroscience*, 11(11), pp.1253–1255.
- Kortekaas, P. & Wadman, W.J., 1997. Development of HVA and LVA calcium currents in pyramidal CA1 neurons in the hippocampus of the rat. *Brain research. Developmental brain research*, 101(1-2), pp.139–147.
- Kosenko, A. & Hoshi, N., 2013. A change in configuration of the calmodulin-KCNQ channel complex underlies Ca^{2+} -dependent modulation of KCNQ channel activity. *PloS one*, 8(12), p.e82290.
- Kuo, C. & Bean, B.P., 1994. Na^+ channels must deactivate to recover from inactivation. *Neuron*, 12(4), pp.819–829.
- Kurtz, Z., Tookey, P. & Ross, E., 1998. Epilepsy in young people: 23 year follow up of the British national child development study. *BMJ*, 316, pp.339–342.
- Lai, H.C. & Jan, L.Y., 2006. The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels. *Nature reviews. Neuroscience*, 7(7), pp.548–562.
- Lamas, J.A., Reboreda, A. & Codesio, V., 2002. Ionic basis of the resting membrane potential in cultured rat sympathetic neurons. *Neuroreport*, 13, pp.1–7.
- Lambert, N.A. & Wilson, W.A., 1996. High-threshold Ca^{2+} currents in rat hippocampal interneurons and their selective inhibition by activation of GABA_B receptors. *The Journal of physiology*, 492(1), pp.115–127.
- Lancaster, B. & Adams, P.R., 1986. Calcium-dependent current generating the afterhyperpolarization of hippocampal neurons. *Journal of neurophysiology*, 55(6), pp.1268–1282.
- Lancaster, B. & Nicoll, R.A., 1987. Properties of two calcium-activated hyperpolarizations in rat hippocampal neurones. *The Journal of physiology*, 389, pp.187–203.
- Langston, R. et al., 2010. Development of the spatial representation system in the rat. *Science*, 328(5985), pp.1576–1580.

- Lapicque, L., 1907. Recherches quantitatives sur l'excitation électrique des nerfs traitée comme une polarisation. *Journal of physiologie et pathologie générale*, 9, pp.620–635.
- Lapicque, L., 1926. *L'Excitabilité en Fonction du Temps.*, Les presses universitaires de France.
- Lenck-Santini, P.P. & Holmes, G.L., 2008. Altered Phase Precession and Compression of Temporal Sequences by Place Cells in Epileptic Rats. *The Journal of Neuroscience*, 28(19), pp.5053–5062.
- Leung, L.W.S. & Yim, C.Y.C., 1991. Intrinsic membrane potential oscillations in hippocampal neurons *in vitro*. *Brain Research*, 553(2), pp.261–274.
- Lewis, A.S., Estep, C.M. & Chetkovich, D.M., 2010. The fast and slow ups and downs of HCN channel regulation. *Channels*, 4(3), pp.215–231.
- Liao, D., Zhang, X., O'Brien, R., Ehlers, M.D. & Huganir, R.L., 1999. Regulation of morphological postsynaptic silent synapses in developing hippocampal neurons. *Nature neuroscience*, 2(1), pp.37–43.
- Lien, C.C. & Jonas, P., 2003. Kv3 potassium conductance is necessary and kinetically optimized for high-frequency action potential generation in hippocampal interneurons. *The Journal of neuroscience*, 23(6), pp.2058–2068.
- Lin, L., Sun, W., Wikenheiser, A.M., Kung, F. & Hoffman, D.A. 2011. KChIP4a regulates Kv4.2 channel trafficking through PKA phosphorylation. *Molecular and cellular neurosciences*, 43(3), pp.315–325.
- Liu, P.W. & Bean, B.P., 2014. Kv2 Channel Regulation of Action Potential Repolarization and Firing Patterns in Superior Cervical Ganglion Neurons and Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons. *The Journal of neuroscience*, 34(14), pp.4991–5002.
- Llinas, R., 1988. The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science*, 232, pp.405–419.
- Llinás, R.R. & Steriade, M., 2006. Bursting of thalamic neurons and states of vigilance. *Journal of neurophysiology*, 95(6), pp.3297–3308.
- Lopez de Armentia, M., Jancic, D., Olivares, R., Alarcon, J.M., Kandel, E.R & Barco, A., 2007. cAMP response element-binding protein-mediated gene expression increases the intrinsic excitability of CA1 pyramidal neurons. *The Journal of neuroscience*, 27, pp.13909–13918.
- Lorente de Nó, R., 1934. Studies on the structure of the cerebral cortex II. Continuation of the study of the Ammonic system. *J. Psychol. Neurol.*, 46, pp.113–117.
- Lunko, O., Isaev, D., Maximyuk, O., Ivanchick, G., Sydorenko, V., Krishtal, O. & Isaeva, E., 2014. Persistent sodium current properties in hippocampal CA1 pyramidal neurons of young and adult rats. *Neuroscience letters*, 559, pp.30–33.
- Lüthi, A. & McCormick, D.A., 1998. H-Current: Properties of a Neuronal and network pacemaker. *Neuron*, 21, pp.9–12.

- Lynch, G., Larson, J., Kelso, S., Barrionuevo, G. & Schottler, F., 1983. Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. *Nature*, 305, pp.719–721.
- Ma, M. & Koester, J., 1996. The role of K^+ currents in frequency-dependent spike broadening in Aplysia R20 neurons: a dynamic-clamp analysis. *The Journal of neuroscience*, 16(13), pp.4089–4101.
- MacDonald, S.H.F., Ruth, P., Knaus, H.G. & Shipston, M.J. 2006. Increased large conductance calcium-activated potassium (BK) channel expression accompanied by STREX variant downregulation in the developing mouse CNS. *BMC developmental biology*, 6, p.37.
- Madeja, M., 2000. Do neurons have a reserve of sodium channels for the generation of action potentials? A study on acutely isolated CA1 neurons from the guinea-pig hippocampus. *The European journal of neuroscience*, 12(1), pp.1–7.
- Magee, J.C., 2000. Dendritic integration of excitatory synaptic input. *Nature reviews. Neuroscience*, 1(3), pp.181–190.
- Magee, J.C. & Carruth, M., 1999. Dendritic Voltage-Gated Ion Channels Regulate the Action Potential Firing Mode of Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons. *Journal of neurophysiology*, 82, pp.1895–1901.
- Magee, J.C. & Johnston, D., 1995. Characterization of single voltage-gated Na^+ and Ca^{2+} channels in apical dendrites of rat CA1 pyramidal neurons. , pp.67–90.
- Magee, J.C. & Johnston, D., 1997. A synaptically controlled, associative signal for Hebbian plasticity in hippocampal neurons. *Science*, 275(5297), pp.209–213.
- Malenka, R.C., Kauer, J.A., Zucker, R.S. & Nicoll, R.A., 1988. Postsynaptic calcium is sufficient for potentiation of hippocampal synaptic transmission. *Science*, 242(4875), pp.81–84.
- Malinow, R. & Malenka, R.C., 2002. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annual review of neuroscience*, 25, pp.103–126.
- Marder, E. & Goaillard, J.M., 2006. Variability, compensation and homeostasis in neuron and network function. *Nature reviews. Neuroscience*, 7(7), pp.563–574.
- Markram, H., Lubke, J., Frotscher, M. & Sakmann, B., 1997. Regulation of synaptic efficacy by coincidence of postsynaptic APs and EPSPs. *Science*, 275, pp.213–215.
- Markram, H. & Sakmann, B., 1994. Calcium transients in dendrites of neocortical neurons evoked by single subthreshold excitatory postsynaptic potentials via low-voltage-activated calcium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(11), pp.5207–5211.
- Martin, E.D., Araque, A. & Buño, W., 2001. Synaptic regulation of the slow Ca^{2+} -activated K^+ current in hippocampal CA1 pyramidal neurons: implication in epileptogenesis. *Journal of neurophysiology*, 86, pp.2878–2886.
- Martina, M., Schultz, J.H., Ehmke, H., Monyer, H. & Jonas, P., 1998. Functional and Molecular Differences between Voltage-Gated K^+ Channels of Fast-Spiking Interneurons and

- Pyramidal Neurons of Rat Hippocampus. *The Journal of neuroscience*, 18(20), pp.8111–8125.
- Martina, M. & Jonas, P., 1997. Functional differences in Na⁺ channel gating between fast-spiking interneurons and principal neurons of rat hippocampus Na⁺. *The Journal of physiology*, 505(3), pp.593–603.
- Martinello, K. et al., 2015. Cholinergic afferent stimulation induces axonal function plasticity in adult hippocampal granule cells. *Neuron*, 85(2), pp.346–363.
- Masukawa, L.M., Benardo, L.S. & Prince, D.A., 1982. Variations in electrophysiological properties of hippocampal neurons in different subfields. *Brain Research*, 242(2), pp.341–344.
- Mathie, A., Al-Moubarak, E. & Veale, E.L., 2010. Gating of two pore domain potassium channels. *The Journal of physiology*, 588(Pt 17), pp.3149–3156.
- Mattia, D., Kawasaki, H. & Avoli, M., 1997. *In vitro* electrophysiology of rat subicular bursting neurons. *Hippocampus*, 7, pp.48–57.
- Mayer, M.L. & Sugiyama, K., 1988. A modulatory action of divalent cations on transient outward current in cultured rat sensory neurones. *The Journal of physiology*, 396, pp.417–433.
- McCormick, D.A., Connors, B.W., Lighthall, J.W. & Prince, D.A., 1985. Comparative Electrophysiology of Pyramidal and Sparsely Spiny Stellate Neurons of the Neocortex. *Journal of neurophysiology*, 54(4), pp.782–806.
- McCormick, D.A. & Pape, H., 1990. Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurons. *The Journal of physiology*, 431, pp.291–318.
- McCormick, D.A. & Prince, D.A., 1987. Post-natal development of electrophysiological properties of rat cerebral cortical pyramidal neurones. *The Journal of physiology*, 393, pp.743–762.
- McKay, B.E., McRory, J.E., Molineux, M.L., Hamid, J., Snutch, T.P., Zamponi, G.W. & Turner, R.W., 2006. Cav3 T-type calcium channel isoforms differentially distribute to somatic and dendritic compartments in rat central neurons. *European Journal of Neuroscience*, 24(9), pp.2581–2594.
- McKay, B.M., Oh, M.M. & Disterhoft, J.F., 2013. Learning increases intrinsic excitability of hippocampal interneurons. *The Journal of neuroscience*, 33(13), pp.5499–5506.
- Menegola, M., Misonou, H., Vacher, H. & Trimmer, J.S. 2008. Dendritic A-type potassium channel subunit expression in CA1 hippocampal interneurons. *Neuroscience*, 154(3), pp.953–964.
- Menendez de la Prida, L., 2003. Control of bursting by local inhibition in the rat subiculum *in vitro*. *The Journal of physiology*, 549(Pt 1), pp.219–230.

- Menendez de la Prida, L. et al., 2014. Conundrums of High-Frequency Oscillations (80–800 Hz) in the Epileptic Brain. *Journal of clinical neurophysiology*, 32(3), pp.207–219.
- Metz, A.E., Jarsky, T., Martina, M. & Spruston, N., 2005. R-type calcium channels contribute to afterdepolarization and bursting in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *The Journal of neuroscience*, 25(24), pp.5763–5773.
- Metz, A.E., Spruston, N. & Martina, M., 2007. Dendritic D-type potassium currents inhibit the spike afterdepolarization in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *The Journal of physiology*, 581(Pt 1), pp.175–187.
- Migliore, M., Hoffman, D.A., Magee, J.C. & Johnston, D., 1999. Role of an A-type K⁺ conductance in the back-propagation of action potentials in the dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Journal of computational neuroscience*, 7(1), pp.5–15.
- Mitterdorfer, J. & Bean, B.P., 2002. Potassium currents during the action potential of hippocampal CA3 neurons. *The Journal of neuroscience*, 22(23), pp.10106–10115.
- Mogul, D.J. & Fox, A.P., 1991. Evidence for multiple types of Ca²⁺ channels in acutely isolated hippocampal CA3 neurones of the Guinea-pig. *The Journal of physiology*, 433, pp.259–281.
- Molineux, M.L., Fernandez, F.R., Mehaffey, W.H. & Turner, R.W., 2005. A-Type and T-Type Currents Interact to Produce a Novel Spike Latency-Voltage Relationship in Cerebellar Stellate Cells. *The Journal of Neuroscience*, 25(47), pp.10863–10873.
- Monaghan, M.M., Menegola, M., Vacher, H., Rhodes, K.J. & Trimmer, J.S., 2008. Altered expression and localization of hippocampal A-type potassium channel subunits in the pilocarpine-induced model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, 156(3), pp.550–62.
- Moody, W.J., 1998. Control of spontaneous activity during development. *Journal of neurobiology*, 37(1), pp.97–109.
- Morin, F., Beaulieu, C. & Lacaille, J.C., 1998. Cell-specific alterations in synaptic properties of hippocampal CA1 interneurons after kainate treatment. *Journal of neurophysiology*, 80, pp.2836–2847.
- Morris, R.G.M., Garrud, P., Rawlins, J.N.P. & O'Keefe, J., 1982. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, 297, pp. 681–683.
- Moulder, K.L., Cormier, R.J., Shute, A.A., Zurumski, C.F. & Mennerick, S., 2003. Homeostatic effects of depolarization on Ca²⁺ influx, synaptic signaling, and survival. *The Journal of neuroscience*, 23(5), pp.1825–1831.
- Moyer, J.R. Jr., Deyo, R.A. & Disterhoft, J.F., 1990. Hippocampectomy disrupts trace eye-blink conditioning in rabbits. *Behavioral neuroscience*, 104, pp. 243–252.
- Mozzachiodi, R. & Byrne, J.H., 2010. More than synaptic plasticity: role of nonsynaptic plasticity in learning and memory. *Trends in neurosciences*, 33(1), pp.17–26.

- Muñoz-Cuevas, J., Vara, H. & Colino, A., 2004. Characterization of release-independent short-term depression in the juvenile rat hippocampus. *The Journal of physiology*, 558(Pt 2), pp.527–548.
- Naraghi, M. & Neher, E., 1997. Linearized buffered Ca^{2+} diffusion in microdomains and its implications for calculation of $[\text{Ca}^{2+}]$ at the mouth of a calcium channel. *The Journal of neuroscience*, 17(18), pp.6961–6973.
- Narayanan, R., Dougherty, K.J. & Johnston, D., 2010. Calcium store depletion induces persistent perisomatic increases in the functional density of h channels in hippocampal pyramidal neurons. *Neuron*, 68(5), pp.921–935.
- Narayanan, R. & Johnston, D., 2007. Long-Term Potentiation in Rat Hippocampal Neurons Is Accompanied by Spatially Widespread Changes in Intrinsic Oscillatory Dynamics and Excitability. *Neuron*, 56(6), pp.1061–1075.
- Neher, E. & Sakaba, T., 2008. Multiple Roles of Calcium Ions in the Regulation of Neurotransmitter Release. *Neuron*, 59(6), pp.861–872.
- Nelson, S.B. & Turrigiano, G.G., 2008. Strength through diversity. *Neuron*, 60(3), pp.477–482.
- Neunuebel, J.P. & Knierim, J.J., 2014. CA3 retrieves coherent representations from degraded input: direct evidence for CA3 pattern completion and dentate gyrus pattern separation. *Neuron*, 81(2), pp. 416–427.
- Ngo-Anh, T.J., Bloodgood, B.L., Lin, M., Sabatini, B.L., Maylie, J. & Adelman, J.P., 2005. SK channels and NMDA receptors form a Ca^{2+} -mediated feedback loop in dendritic spines. *Nature neuroscience*, 8(5), pp.642–649.
- Niven, J.E. & Burrows, M., 2003. Spike width reduction modifies the dynamics of short-term depression at a central synapse in the locust. *The Journal of neuroscience*, 23(20), pp.7461–7469.
- Noble, D. & Stein, R.B., 1966. The threshold conditions for initiation of action potentials by excitable cells. *The Journal of physiology*, 187, pp.129–162.
- Norris, A.J., Foeger, N.C. & Nerbonne, J.M., 2011. Neuronal voltage-gated K (Kv) channels function in macromolecular complexes. *Neuroscience letters*, 486(2), pp.73–77.
- Numann, R.E., Wadman, W.J. & Wong, K.S., 1987. Outward currents of single hippocampal cells obtained from the adult Guinea-pig. *The Journal of physiology*, 393, pp.331–353.
- O'Donnell, P. & Grace, A., 1995. Synaptic interactions among excitatory afferents to nucleus accumbens neurons: hippocampal gating of prefrontal cortical input. *The Journal of neuroscience*, 15, pp.3622–3639.
- O'Keefe, J. & Recce, M., 1993. Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. *Hippocampus*, 3(3), pp.317–330.

- O'Leary, T., van Rossum, M.C.W. & Wyllie, D.J.A, 2010. Homeostasis of intrinsic excitability in hippocampal neurones: dynamics and mechanism of the response to chronic depolarization. *The Journal of physiology*, 588(Pt 1), pp.157–170.
- Ogiwara, I. et al., 2007. Nav1.1 Localizes to Axons of Parvalbumin-Positive Inhibitory Interneurons: A Circuit Basis for Epileptic Seizures in Mice Carrying an *Scn1a* Gene Mutation. *The Journal of Neuroscience*, 27(22), pp.5903–5914.
- Oh, M.M., McKay, B.M., Power, J.M. & Disterhoft, J.F., 2009. reduction in CA1 pyramidal neurons is mediated by protein kinase A. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(5), pp.1620–1625.
- Ohtsuki, G., Piochon, C., Adelman, J.P. & Hansel, C., 2012. SK2 channel modulation contributes to compartment-specific dendritic plasticity in cerebellar Purkinje cells. *Neuron*, 75(1), pp.108–120.
- Patel, A.J. & Honoré, E., 2001. Properties and modulation of mammalian 2P domain K⁺ channels. *Trends in Neurosciences*, 24(6), pp.339–346.
- Peng, X.Q., Zhang, X.L., Fang, Y., Xie, W.R. & Xie, Y.K., 2004. Sialic acid contributes to hyperexcitability of dorsal root ganglion neurons in rats with peripheral nerve injury. *Brain research*, 102, pp.185–193.
- Perez-Reyes, E., 2003. Molecular Physiology of Low-Voltage-Activated T-type Calcium Channels. *Physiological reviews*, 83(1), pp.117–161.
- Peters, H.C., Hu, H., Pongs, O., Storm, J.F. & Isbrandt, D., 2005. Conditional transgenic suppression of M channels in mouse brain reveals functions in neuronal excitability, resonance and behavior. *Nature neuroscience*, 8(1), pp.51–60.
- Petersen, C.C., Hahn. T.T., Mehta.. M., Grinvald, A. & Sakmann, B., 2003. Interaction of sensory responses with spontaneous depolarization in layer 2/3 barrel cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, pp.13638–13643.
- Pokorny, J. & Yamamoto, T., 1981a. Postnatal Ontogenesis of Hippocampal CA1 Area in Rats. I. Development of Dendritic Arborisation in Pyramidal Neurons. *Brain research bulletin*, 7, pp.113–120.
- Pokorny, J. & Yamamoto, T., 1981b. Postnatal Ontogenesis of Hippocampal CA1 Area in Rats. II. Development of Ultrastructure in Stratum Lacunosum and Moleculare. *Brain research bulletin*, 7, pp.121–130.
- Pongs, O. & Schwarz, J.R., 2010. Ancillary subunits associated with voltage-dependent K⁺ channels. *Physiological reviews*, 90, pp.755–796.
- Poolos, N.P. & Johnston, D., 1999. Calcium-Activated Potassium Conductances Contribute to Action Potential Repolarization at the Soma But Not the Dendrites of Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons. *The Journal of neuroscience*, 19(13), pp.5205–5212.

- Potthoff, O. & Dietzel, I.D., 1997. Thyroid hormone regulates Na⁺ currents in cultured hippocampal neurons from postnatal rats. *Proceedings. Biological sciences*, 264, pp.367–373.
- Qian, J. & Saggau, P., 1999. Activity-dependent modulation of K⁺ currents at presynaptic terminals of mammalian central synapses. *The Journal of physiology*, 519, pp.427–437.
- Qiu, C., Johnson, B.N. & Tallent, M.K., 2007. K⁺ M-current regulates the transition to seizures in immature and adult hippocampus. *Epilepsia*, 48(11), pp.2047–2058.
- Ramakers, G.M.J. & Storm, J.F., 2002. A postsynaptic transient K⁺ current modulated by arachidonic acid regulates synaptic integration and threshold for LTP induction in hippocampal pyramidal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(15), pp.10144–10149.
- Raman, I.M. & Bean, B.P., 1997. Resurgent Sodium Current and Action Potential Formation in Dissociated Cerebellar Purkinje Neurons. *The Journal of neuroscience*, 17(12), pp.4517–4526.
- Randall, A.D. & Tsien, R.W., 1997. Contrasting biophysical and pharmacological properties of T-type and R-type calcium channels. *Neuropharmacology*, 36(7), pp.879–893.
- Ransdell, J.L., Nair, S.S. & Schulz, D.J., 2012. Rapid homeostatic plasticity of intrinsic excitability in a central pattern generator network stabilizes functional neural network output. *The Journal of neuroscience*, 32(28), pp.9649–9658.
- Rehak, R., Bartoletti, T.M., Engbers, J.D.T., Berecki, G., Turner, R.W. & Zamponi, G.W., 2013. Low voltage activation of KCa1.1 current by Cav3-KCa1.1 complexes. *PloS one*, 8(4), p.e61844.
- Remy, S., Beck, H. & Yaari, Y., 2010. Plasticity of voltage-gated ion channels in pyramidal cell dendrites. *Current opinion in neurobiology*, 20(4), pp.503–509.
- Reyes, A., 2001. Influence of dendritic conductances on the input-output properties of neurons. *Annual review of neuroscience*, 24(24), pp.653–675.
- Ribeiro, M.A. & Costa, P.F., 2000. Kinetic parameters of calcium currents in maturing acutely isolated CA1 cells. *Developmental Brain Research*, 124(1-2), pp.11–23.
- De Ridder, D., Vanneste, S., Langguth, B. & Llinas, R., 2015. Thalamocortical Dysrhythmia: A Theoretical Update in Tinnitus. *Frontiers in Neurology*, 6(June), pp.1–13.
- Roeper, J., Lorra, C. & Pongs, O., 1997. Frequency-dependent inactivation of mammalian A-type K⁺ channel K_v1.4 regulated by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase. *The Journal of neuroscience*, 17(10), pp.3379–3391.
- Rosato-Siri, M.D. et al., 2015. A Novel Modulator of Kv3 Potassium Channels Regulates the Firing of Parvalbumin-Positive Cortical Interneurons. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 354(3), pp.251–260.

- Royeck, M., Horstmann, M.T., Remy, S., Reitze, M., Yaari, Y. & Beck, H., 2008. Role of axonal Nav1.6 sodium channels in action potential initiation of CA1 pyramidal neurons. *Journal of neurophysiology*, 100(4), pp.2361–2380.
- Rüschenschmidt, C., Straub, H., Köhling, R., Siep, E., Gorji, A. & Speckmann, E.J., 2004. Reduction of human neocortical and guinea pig CA1-neuron A-type currents by organic calcium channel blockers. *Neuroscience letters*, 368(1), pp.57–62.
- Sachdev, R., Ebner, F. & Wilson, C., 2004. Effect of subthreshold up and down states on the whisker-evoked response in somatosensory cortex. *Journal of neurophysiology*, 92, pp.3511–3521.
- Safiulina, V.F., Zacchi, P., Taglialatela, M., Yaari, Y & Cherubini, E., 2008. Low expression of Kv7/M channels facilitates intrinsic and network bursting in the developing rat hippocampus. *The Journal of physiology*, 586(Pt 22), pp.5437–5453.
- Sah, P., 1996. Ca²⁺-activated K⁺ currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *Trends in neurosciences*, 19, pp.150–154.
- Sah, P. & Faber, E.S.L., 2002. Channels underlying neuronal calcium-activated potassium currents. *Progress in neurobiology*, 66, pp.345–353.
- Sanabria, E.R.G., Su, H. & Yaari, Y., 2001. Initiation of network bursts by Ca²⁺-dependent intrinsic bursting in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Journal of Physiology*, 532(1), pp.205–216.
- Sánchez-Alonso, J.L., Muñoz-Cuevas, J., Vicente-Torres, M.A. & Colino, A., 2010. Role of low-voltage-activated calcium current on the firing pattern alterations induced by hypothyroidism in the rat hippocampus. *Neuroscience*, 171(4), pp.993–1005.
- Sánchez-Alonso, J.L., Sánchez-Aguilera, A., Vicente-Torres, M.A. & Colino, A., 2012. Intrinsic excitability is altered by hypothyroidism in the developing hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience*, 207, pp.37–51.
- Saviane, C., Mohajerani, M.H. & Cherubini, E., 2003. An I_D-like current that is downregulated by Ca²⁺ modulates information coding at CA3-CA3 synapses in the rat hippocampus. *The Journal of physiology*, 552(Pt 2), pp.513–524.
- Schorge, S. & Walker, M.C., 2009. A self-activating intrinsic brake on bursting in CA3 neurons. *The Journal of physiology*, 587(Pt 6), pp.1143–1144.
- Schwartzkroin, P.A., 1975. Characteristics of CA1 neurons recorded intracellularly in the hippocampal in vitro slice preparation. *Brain research*, 85, pp.423–436.
- Schwartzkroin, P.A. & Kunkel, D., 1982. Electrophysiology and morphology of the developing hippocampus of fetal rabbits. *The Journal of neuroscience*, 2(4), pp.448–462.
- Selig, D.K. & Malenka, R.C., 1997. *Axobits*, 20, pp.7–10. Axon Instruments, Inc. New Product News.

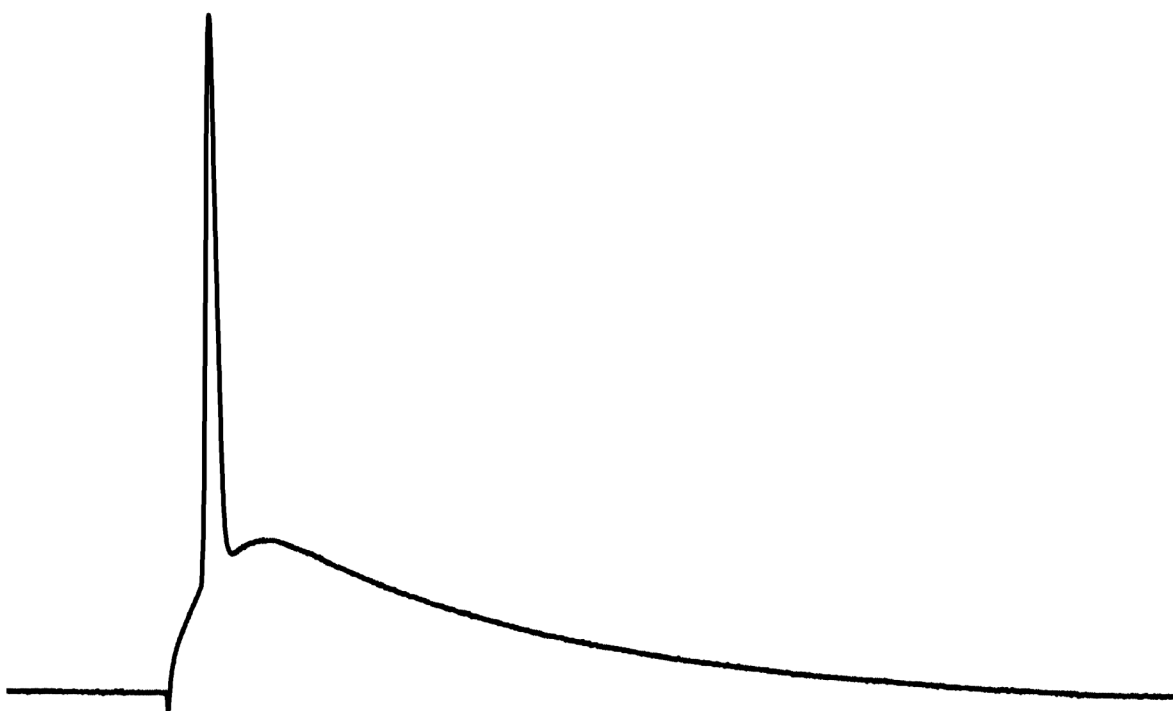
- Shah, M.M., Migliore, M., Valencia, I., Cooper, E.C. & Brown, D.A., 2008. Functional significance of axonal Kv7 channels in hippocampal pyramidal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(22), pp.7869–7874.
- Shao, L., Halvorsrud, R., Borg-Graham, L. & Storm, J.F., 1999. The role of BK-type Ca^{2+} -dependent K^+ channels in spike broadening during repetitive firing in rat hippocampal pyramidal cells. *The Journal of physiology*, 521(1), pp.135–146.
- Shu, Y., Hasenstaub, A., Duque, A., Yu, Y. & McCormick, D.A. 2006. Modulation of intracortical synaptic potentials by presynaptic somatic membrane potential. *Nature*, 441(8), pp.761–765.
- Shu, Y., Duque, A., Yu, Y. Haider, B. & McCormick, D.A., 2007. Properties of action-potential initiation in neocortical pyramidal cells: evidence from whole cell axon recordings. *Journal of neurophysiology*, 97(1), pp.746–760.
- Shu, Y., Yu, Y., Yang, J. & McCormick, D.A., 2007. Selective control of cortical axonal spikes by a slowly inactivating K^+ current. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(27), pp.11453–11458.
- Skov, J., Andreasen, M. & Nedergaard, S., 2006. Postnatal development of a new type of epileptiform activity in the rat hippocampus. *Brain research*, 1096(1), pp.61–69.
- Spigelman, I., Zhang, L. & Carlen, P.L., 1992. Patch-clamp study of postnatal development of CA1 neurons in rat hippocampal slices: membrane excitability and K^+ currents. *Journal of neurophysiology*, 68(1), pp.55–69.
- Springer, S.J., Burkett, B.J. & Schrader, L.A, 2015. Modulation of BK channels contributes to activity-dependent increase of excitability through MTORC1 activity in CA1 pyramidal cells of mouse hippocampus. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8(January), p.451.
- Squire, L.R., Stark, C.E.L. & Clark, R.E., 2004. The medial temporal lobe. *Annual review of neuroscience*, 27, pp. 279-306.
- Steinert, J.R., Robinson, S.W., Tong, H., Hausteiner, M.D., Kopp-Scheinflug, C. & Forsythe, I.D., 2011. Nitric oxide is an activity-dependent regulator of target neuron intrinsic excitability. *Neuron*, 71(2), pp.291–305.
- Stocker, M., 2004. Ca^{2+} -activated K^+ channels: molecular determinants and function of the SK family. *Nature reviews. Neuroscience*, 5(10), pp.758–770.
- Storm, J.F., 1987. Action potential repolarization and a fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *The Journal of physiology*, 385, pp.733–759.
- Storm, J.F., 1988. Temporal integration by a slowly inactivating K^+ current in hippocampal neurons. *Nature*, 336, pp.379–381.
- Stuart, G., Spruston, N., Sakmann, B. & Hausser, M., 1997. Action potential initiation and backpropagation in neurons of the mammalian CNS. *Trends in Neurosciences*, 20(3), pp.125–131.

- Su, H., Alroy, G., Kirson, E.D. & Yaari, Y., 2001. Extracellular calcium modulates persistent sodium current-dependent burst-firing in hippocampal pyramidal neurons. *The Journal of neuroscience*, 21(12), pp.4173–4182.
- Su, H., Sochivko, D., Becker, A., Chen, J., Jiang, Y., Yaari, Y. & Beck, H., 2002. Upregulation of a T-type Ca^{2+} channel causes a long-lasting modification of neuronal firing mode after status epilepticus. *The Journal of neuroscience*, 22(9), pp.3645–3655.
- Sun, L. et al., 2009. Differential regulation of action potentials by inactivating and noninactivating BK channels in rat adrenal chromaffin cells. *Biophysical journal*, 97(7), pp.1832–1842.
- Surges, R., Brewster, A.L., Bender, R.A., Beck, H., Feuerstein, T.J. & Baram, T.Z., 2006. Regulated expression of HCN channels and cAMP levels shape the properties of the h current in developing rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, 24(1), pp.94–104.
- Takahashi, K., Ueno, S. & Akaike, N., 1991. Kinetic properties of T-type Ca^{2+} currents in isolated rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Journal of neurophysiology*, 65(1), pp.148–155.
- Talley, E.M., Cribbs, L.L., Lee, J.H., Perez-Reyes, E. & Bayliss, D.A., 1999. Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. *The Journal of neuroscience*, 19(6), pp.1895–1911.
- Taskin, B., von Schoubye, N.L., Sheykhzade, M., Bastlund, J.F., Grunnet, M. & Jespersen, T., 2015. Biophysical characterization of KV3.1 potassium channel activating compounds. *European journal of pharmacology*, 758, pp.164–170.
- Thompson, S.M. & Wong, R.K.S., 1991. Development of calcium current subtypes in isolated rat hippocampal pyramidal cells. *The Journal of physiology*, 439, pp.671–689.
- Tong, H., Steinert, J.R., Robinson, S.W., Chernova, T., Read, D.J., Oliver, I. & Forsythe, I.D. 2010. Regulation of Kv channel expression and neuronal excitability in rat medial nucleus of the trapezoid body maintained in organotypic culture. *The Journal of physiology*, 588(Pt 9), pp.1451–1468.
- Trimmer, J.S., 2015. Subcellular Localization of K^+ Channels in Mammalian Brain Neurons: Remarkable Precision in the Midst of Extraordinary Complexity. *Neuron*, 85(2), pp.238–256.
- Trombin, F., Gnatkovsky, V. & de Curtis, M., 2011. Changes in action potential features during focal seizure discharges in the entorhinal cortex of the *in vitro* isolated guinea pig brain. *Journal of neurophysiology*, 106, pp.1411–1423.
- Turrigiano, G., 1995. Selective regulation of current densities underlies changes in the activity of cultured neurons. *The Journal of neuroscience*, 15(5), pp.3640–3652.
- Turrigiano, G.G., Leslie, K.R., Desai, N.S., Rutherford, L.C. & Nelson, S.B., 1998. Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature*, 391(6670), pp.892–896.

- Turrigiano, G.G., Abbott, L.F. & Marder, E., 1994. Activity-dependent changes in the intrinsic properties of cultured neurons. *Science*, 264(5161), pp.974–977.
- Turrigiano, G.G. & Nelson, S.B., 2000. Hebb and homeostasis in neuronal plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, 10(3), pp.358–364.
- Valero-Aracama, M.J., Sauvage, M.M. & Yoshida, M., 2015. Environmental enrichment modulates intrinsic cellular excitability of hippocampal CA1 pyramidal cells in a housing duration and anatomical location-dependent manner. *Behavioural brain research*, 292, pp.209–218.
- Van Elburg, R. A. J. & van Ooyen, A., 2010. Impact of dendritic size and dendritic topology on burst firing in pyramidal cells. *PLoS computational biology*, 6(5), p.e1000781.
- Vasilyev, D. V & Barish, M.E., 2002. Postnatal Development of the Hyperpolarization-Activated Excitatory Current I_h in Mouse Hippocampal Pyramidal Neurons. , 22(20), pp.8992–9004.
- Vervaeke, K., Hu, H., Graham, L.J. & Storm, J.F. 2006. Contrasting effects of the persistent Na^+ current on neuronal excitability and spike timing. *Neuron*, 49, pp.257–270.
- Vinet, J. & Sík, A., 2006. Expression pattern of voltage-dependent calcium channel subunits in hippocampal inhibitory neurons in mice. *Neuroscience*, 143(1), pp.189–212.
- Wang, J., Yeckel, M.F., Johnston, D. & Zucker, R.S., 2004. Photolysis of postsynaptic caged Ca^{2+} can potentiate and depress mossy fiber synaptic responses in rat hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Journal of neurophysiology*, 91(4), pp.1596–1607.
- Wang, T., Wang, J., Cottrell, J.E. & Kass, I.S., 2004. Small physiologic changes in calcium and magnesium alter excitability and burst firing of CA1 pyramidal cells in rat hippocampal slices. *Journal of neurosurgical anesthesiology*, 16(3), pp.201–209.
- Wang, Z. Xu, N.I., Wu, C.P. Duan, S. & Poo, M.M., 2003. Bidirectional changes in spatial dendritic integration accompanying long-term synaptic modifications. *Neuron*, 37(3), pp.463–472.
- Warman, N., Durand, M. & Yuen, L.F., 1994. Reconstruction of Hippocampal CA1 Pyramidal Cell Electrophysiology by Computer Simulation. *Journal of neurophysiology*, 71(6), pp.2033–2045.
- Watanabe, S., Hoffman, D.A., Migliore, M. & Johnston, D., 2002. Dendritic K^+ channels contribute to spike-timing dependent long-term potentiation in hippocampal pyramidal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(12), pp.8366–8371.
- Watt, A.J. & Desai, N.S., 2010. Homeostatic plasticity and STDP: keeping a neuron's cool in a fluctuating world. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 2, pp.1–16.
- Weiss, C., Sametsky, E., Sasse, A., Speiss, J. & Disterhoft, J.F., 2005. Acute stress facilitates trace eyeblink conditioning in C57BL/6 male mice and increases the excitability of their CA1 pyramidal neurons. *Learning & Memory*, 12, pp.138–143.

- Wellmer, J., Su, H., Beck, H. & Yaari, Y., 2002. Long-lasting modification of intrinsic discharge properties in subicular neurons following status epilepticus. *European Journal of Neuroscience*, 16(2), pp.259–266.
- Wilson, C. & Kawaguchi, Y., 1996. The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons. *The Journal of neuroscience*, 16, pp.2397–2410.
- Wu, R.L. & Barish, M.E., 1992. Two pharmacologically and kinetically distinct transient potassium currents in cultured embryonic mouse hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience*, 12(6), pp.2235–2246.
- Wu, R.L. & Barish, M.E., 1999. Modulation of a slowly inactivating potassium current, I_D , by metabotropic glutamate receptor activation in cultured hippocampal pyramidal neurons. *The Journal of neuroscience*, 19(16), pp.6825–6837.
- Wu, W.W., Chan, C.S., Surmeier, D.J. Disterhoft, J.F., 2008. Coupling of L-type Ca^{2+} channels to KV7/KCNQ channels creates a novel, activity-dependent, homeostatic intrinsic plasticity. *Journal of neurophysiology*, 100(4), pp.1897–1908.
- Xu, J., Kang, N., Jiang, L., Nedergaard, M. & Kang, J., 2005. Activity-Dependent Long-Term Potentiation of Intrinsic Excitability in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons. *Journal of Neuroscience*, 25(7), pp.1750–1760.
- Yue, C., Remy, S., Su, H., Beck, H. & Yaari, Y., 2005. Proximal persistent Na^+ channels drive spike afterdepolarizations and associated bursting in adult CA1 pyramidal cells. *The Journal of neuroscience*, 25(42), pp.9704–20.
- Yue, C. & Yaari, Y., 2004. KCNQ/M channels control spike afterdepolarization and burst generation in hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience*, 24(19), pp.4614–24.
- Zhang, B.Y.L., Spigelman, I. & Carlen, P.L., 1991. Development of GABA-mediated, chloride-dependent inhibition in CA1 pyramidal neurones of immature rat hippocampal slices. *Journal of Physiology*, 444, pp.25–49.
- Zhang, L. & McBain, C.J., 1995a. Voltage-gated potassium currents in stratum oriens-alveus inhibitory neurones of the rat CA1 hippocampus. *The Journal of physiology*, 488(3), pp.647–660.
- Zhang, L. & McBain, C.J., 1995b. Potassium conductances underlying repolarization and after-hyperpolarization in rat CA1 hippocampal interneurons. *The Journal of physiology*, 488(3), pp.661–672.
- Zhang, W. & Linden, D.J., 2003. The other side of the engram: experience-driven changes in neuronal intrinsic excitability. *Nature reviews. Neuroscience*, 4(11), pp.885–900.
- Zucker, R.S. & Regehr, W.G., 2002. Short-term synaptic plasticity. *Annual review of physiology*, 64, pp.355–405.

ANEXO: PUBLICACIONES



A novel short-term plasticity of intrinsic excitability in the hippocampal CA1 pyramidal cells

A. Sánchez-Aguilera, J. L. Sánchez-Alonso, M. A. Vicente-Torres and A. Colino

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

Key points

- Changes in neuronal activity often trigger compensatory mechanisms that stabilize neuron output.
- We have identified a novel form of short-term plasticity of membrane excitability, which develops early after the eye-opening period in rats.
- Holding the membrane potential of CA1 neurons at subthreshold depolarization from 15 s to several minutes induces a reduction of the excitability.
- This plasticity requires an influx of T-type Ca^{2+} current that modulates the A-type K^{+} current.
- These results help us understand that the resting potential history could modify cell intrinsic excitability.

Abstract Changes in neuronal activity often trigger compensatory mechanisms aimed at regulating network activity homeostatically. Here we have identified and characterized a novel form of compensatory short-term plasticity of membrane excitability, which develops early after the eye-opening period in rats (P16–19 days) but not before that developmental stage (P9–12 days old). Holding the membrane potential of CA1 neurons right below the firing threshold from 15 s to several minutes induced a potentiation of the repolarizing phase of the action potentials that contributed to a decrease in the firing rate of CA1 pyramidal neurons *in vitro*. Furthermore, the mechanism for inducing this plasticity required the action of intracellular Ca^{2+} entering through T-type Ca^{2+} channels. This increase in Ca^{2+} subsequently activated the Ca^{2+} sensor K^{+} channel interacting protein 3, which led to the increase of an A-type K^{+} current. These results suggest that Ca^{2+} modulation of somatic A-current represents a new form of homeostatic regulation that provides CA1 pyramidal neurons with the ability to preserve their firing abilities in response to membrane potential variations on a scale from tens of seconds to several minutes.

(Received 19 February 2014; accepted after revision 16 April 2014; first published online 22 April 2014)

Corresponding author A. Colino: Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain. Email: colino@ucm.es

Abbreviations AP, action potential; I_A , A-type K^{+} current; KChIP₃, K^{+} channel interacting protein 3; PAR, parameter.

Introduction

Propagation of information in a neural circuit depends on the synaptic connectivity within the circuit as well as on the intrinsic properties of neurons. Activity-dependent changes in synaptic efficacy of neuronal connections can affect the excitation–inhibition balance that determines transmission of processed information to the next relay in the circuit. Similarly, changes in the intrinsic properties

can modulate not only the integrative properties of synapses (Williams & Stuart, 2003; Harnett *et al.* 2013) but also the firing patterns that code for information (Lisman, 1997; Williams & Stuart, 1999; Xu *et al.* 2012; Jacob *et al.* 2012).

During the last decade, there has been increasing evidence demonstrating the existence of plastic activity-dependent changes in the intrinsic excitability of neurons (Raastad & Shepherd, 2003; Muñoz-Cuevas

et al. 2004; Cudmore *et al.* 2010; Grubb & Burrone, 2010; Campanac *et al.* 2013). The mechanisms involved in those plastic events and their time dynamics vary widely, ranging from short-term plastic events that can be induced on a scale of seconds to minutes (Raastad & Shepherd, 2003; Muñoz-Cuevas *et al.* 2004) to homeostatic changes that allow neurons to adapt their firing properties to long-lasting changes (days) in the basal activity of neurons (Grubb & Burrone, 2010; O'Leary *et al.* 2010). All of these forms of intrinsic plasticity are involved in the computational capability of neural circuits either by maintaining homeostasis (Grubb & Burrone, 2010; O'Leary *et al.* 2010), mediating synaptic metaplasticity (Zang & Linden, 2003) and/or simply providing a widespread postsynaptic mechanism through which neurons optimize their input–output relationship during repeated afferent activity (Mahon *et al.* 2003; Soleng *et al.* 2003; Muñoz-Cuevas *et al.* 2004).

In most of the previous studies, intrinsic plasticity was induced by synaptic tetanization or by strong sustained depolarization during several days. To avoid interference of any sort of synaptic activity and strong sustained depolarizations, we studied how sustained depolarization on a scale from hundreds of seconds to a few minutes at subthreshold potential affects intrinsic membrane excitability. We have characterized a novel form of short-term plasticity that appears after the eye-opening period (postnatal, P16–19 days) and that operates through a mechanism involving T-type Ca^{2+} channels and the Ca^{2+} sensor K^{+} channel interacting protein 3 (KCHIP₃) via modulation of the A-current (I_A) K^{+} channels $\text{K}_{v4.2}$. Thus, we suggest that neurons are equipped with tools far more sensitive than expected to adapt themselves to short-lasting changes in subthreshold activity from tens of seconds to minutes.

Methods

Ethical approval

All experimental procedures described below were performed in accordance with the guidelines of the European Union (2003/65/CE) and the Spanish legislation for the use and care of laboratory animals (BOE 1201/2005). The experimental procedures included measures to reduce the number of animals used and to minimize their suffering.

Slice preparation

Hippocampal slices were prepared from male and female rats of two different postnatal periods: P9–12 (pre-eye-opening group, $n = 65$) and P16–19 (post-eye-opening group, $n = 167$). Rats were decapitated

and the hippocampi quickly dissected in cold Krebs' buffer. Slices were placed in a humidified holding chamber for at least 1 h (27–29°C) in recording artificial cerebrospinal fluid (ACSF). A single slice was transferred to the recording chamber and submerged in a continuously superfusing solution saturated with 95% O_2 –5% CO_2 . The composition of ACSF was (in mM): 120 NaCl, 2.5 KCl, 2.5 CaCl_2 , 1.3 MgCl_2 , 26.2 NaHCO_3 , 11 glucose, pH 7.4 when balanced with 95% O_2 –5% CO_2 . Experiments were performed at 27–29°C.

Whole cell patch clamp recordings in hippocampal slices

'Blind' whole cell patch clamp recordings (Blanton *et al.* 1989; Coleman & Miller, 1989) were made from CA1 pyramidal cells. These experiments were performed with electrodes filled with (in mM): 125 potassium gluconate, 8 NaCl, 10 Hepes, 3 Tris-ATP, 0.3 GTP, 2 MgCl_2 ; 20 phosphocreatine, 0.5 CaCl_2 , 10 EGTA and 50 U ml^{-1} creatine phosphokinase. Patch pipettes filled with these solutions (Clark Electromedical, Reading, UK) had resistances of 5–10 M Ω . The glutamate receptor antagonist 6-cyano-7-nitro-quinoxaline-2,3-dione (10 μM) to block fast excitatory postsynaptic potentials, and the GABA_A receptor antagonist picrotoxin (100 μM) to block fast inhibitory postsynaptic potential, were included in ACSF. A peristaltic pump (Gilson, Villiers le Bel, France) was used to circulate the solution (1.5–2 ml min^{-1}) through the recording chamber, keeping the flow rate constant and avoiding any flow artefacts. Pipettes were pulled from borosilicate glass capillaries on a Flaming–Brown micropipette puller (Sutter Instruments, Novato, CA, USA). Current clamp recordings were acquired with an Axoclamp 2A amplifier and Digidata 1322 interface (Molecular Devices, Union City, CA, USA). The pyramidal cells included in this study had stable resting potentials of at least -60 mV and exhibited action potentials (APs) with peak voltage greater than 0 mV. Each cell was recorded in current clamp mode at -60 mV and -80 mV to assess basal and active membrane potential characteristics. Input resistance was calculated in some cells from the steady-state voltage measured in response to a -20 pA current pulse (300 ms duration). Series resistance was compensated for current clamp recordings.

Acutely dissociated neurons

K^{+} currents were recorded in whole cell configuration using the method described in detail by Kay and Wong (1986). In brief, transverse hippocampal slices were cut (500 μm thick) and incubated in ACSF for at least 1 h. Five slices were removed from the holding chamber as required, and the CA1 region was dissected and cut into 0.5 mm^3 cubes, which were incubated at 27–29°C in a

95% O₂ 5% CO₂ saturated saline (in mM): 105 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl₂, 1.3 MgCl₂, 25 glucose and 10 Hepes, with 2 mg ml⁻¹ protease (Sigma type XIV) for 15 min. Cubes were rinsed in the same saline solution without protease. Cells were dissociated by gently triturating the tissue through a series of fire-polished Pasteur pipettes and were plated on to poly-L-lysine-coated coverslips in a perfusion chamber (flow 1.3–1.6 ml min⁻¹) mounted on to a fixed-stage microscope. The composition of the solution was (in mM): 105 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 1.3 MgCl₂, 26.2 NaHCO₃, 3 CoCl₂, 0.0005 TTX, 11 glucose, 0.01 nifedipine, pH 7.4 when balanced with 95% O₂ 5% CO₂. Patch pipettes were filled with a solution containing (in mM): 80 KCl, 10 EGTA, 10 Hepes, 4 Tris-ATP, 0.3 GTP, 4.5 MgCl₂, 14 phosphocreatine and 40 sucrose (adjusted to pH 7.2 with KOH) and attached to cells of pyramidal shape by mild suction. Patch pipettes filled with these solutions (Clark Electromedical) had resistances of 3–7 MΩ. Following seal formation (>2 GΩ) whole cell recordings lasting >40 min were achieved by rupturing the neuronal membrane with further negative pressure. Voltage clamp recordings were acquired with an Axopatch-200B amplifier. Series resistances and membrane capacitances were usually partially compensated (80%) and off-line filtering was not performed.

Protein extraction

Hippocampi from P10 and P17 rats were dissected in cold ACSF. Hippocampi from one to two rats were pooled per sample and homogenized in cold lysis buffer: 0.01 M phosphate-buffered saline (1.47 mM KH₂PO₄, 8.10 mM Na₂HPO₄, 2.67 mM KCl, 137.93 mM NaCl), pH 7.4 (PBS), containing 5 mM EGTA, 5 mM dithiothreitol, 10 mM sodium fluoride, 1 mM phenylmethanesulphonyl fluoride, 1 mM sodium orthovanadate and 2× (1 tablet/5 ml) of a protease inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland). The nuclei were removed by centrifugation at 3000 g at 4°C for 10 min. The resulting supernatant was further centrifuged at 150,000 g for 17 min at 4°C to yield a 'membrane fraction' as a pellet that was resuspended in cold lysis buffer without dithiothreitol. Protein concentrations were determined by using the Bio-Rad Protein Assay dye reagent (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) with bovine serum albumin as a protein standard.

Western blot analysis

Equal amounts (10 µg) of total protein were loaded per lane on a 6.5% gel and separated by SDS-PAGE. After separation, proteins were transferred on to nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). The membranes were blocked with 5% non-fat milk in PBS containing 0.1% of Tween 20 (PBS-T) and incubated with rabbit anti-Ca_v3.2

1:1500 (Alomone Laboratories, Jerusalem, Israel), mouse anti-K_v4.2 1:800 (Acris Antibodies, San Diego, CA, USA) and mouse anti-beta actin 1:5000 (Sigma, St Louis, MO, USA). Immunodetection was undertaken using peroxidase-conjugated secondary antibodies and enhanced chemiluminescence with ECL reagents (Amersham Biosciences). Semiquantitative analysis of the bands was performed using laser-scanned densitometry analysis (Quantity One; Bio-Rad) and the individual ratios to actin densities were normalized with respect to the post-natal age 10.

Data analysis

AP parameters were analysed for the first AP induced by a 5 ms current injection on CA1 pyramidal neurons recorded under current clamp mode. Voltage spike threshold was defined as the membrane potential at which dV/dt first exceeds 10 V s⁻¹ (Fricker *et al.* 1999). The AP amplitude was measured as the difference between the peak voltage and the threshold. The AP depolarization rate was measured as the slope between 10% and 90% of the AP amplitude. The fast repolarization rate was measured using the slope of the first third of the repolarizing phase, beginning 300 µs after the AP peak. The AP half-width was the width of the AP at 50% of its peak amplitude. To study the temporal profile of the plasticity induction process we have defined the percentage of the plasticity as: $[(par_{1s} - par_{test}) / (par_{1s} - par_{15min})] \times 100$, where par_{test} is the test parameter of the AP evoked at each depolarization duration (1, 15, 30, 60, 90, 180, 300, 450, 600 and 900 s), par_{1s} is the parameter of the AP evoked at 1 s depolarization duration (without plasticity established) and par_{15min} is the parameter of the AP evoked at 15 min depolarization duration (with plasticity established). To study the temporal profile of the plasticity disappearance process we have defined the percentage of the plasticity as: $[(par_{15min} - par_{test}) / (par_{15min} - par_{1s})] \times 100$, where par_{test} is the test parameter of the AP evoked at each hyperpolarization duration (1, 15, 30, 60, 90, 180, 300, 450, 600 and 900 s), par_{1s} is the parameter of the AP evoked at 1 s hyperpolarization duration (with plasticity) and par_{15min} is the parameter of the AP evoked at 15 min hyperpolarization duration (without plasticity). Data were analysed using Student's *t* test (paired or unpaired), considering *P* < 0.05 as statistically significant. Recordings and values were corrected for their junction potential.

Chemicals

All of the chemicals and drugs were obtained from Sigma (St Louis, MO, USA), except TTX (Alomone Laboratories), mouse anti-KChIP₃ (NeuroMab, Davis, CA, USA) or where noted otherwise.

Table 1. Basic membrane properties in CA1 neurons

Age	Resting potential (mV)	Group	Rm (MΩ)	Cm (pF)	τ (ms)
P9–12 (100)	−70.3 ± 0.3	−80 mV	189.5 ± 6.3	129.9 ± 3.0	23.3 ± 0.5
		−60 mV	379.9 ± 11.2***	133.1 ± 3.0	48.8 ± 1.2***
P16–19 (188)	−71.5 ± 0.7	−80 mV	94.2 ± 1.4	212.4 ± 3.5	19.7 ± 0.4
		−60 mV	209.0 ± 3.9***	206.2 ± 3.9	41.8 ± 0.8***

Effect of the short-lasting depolarization on the basic membrane properties during postnatal development. Rm, membrane resistance; Cm, membrane capacitance. *** $P < 0.001$.

Table 2. Parameters of action potentials elicited in CA1 neurons

Age	Group	Amplitude (mV)	Threshold (mV)	Depolarization rate (mV ms ^{−1})	Repolarization rate (mV ms ^{−1})	Half-Width (ms)
P9–12 (36)	−80 mV	72.1 ± 1.4	−53.1 ± 0.5	142.8 ± 4.7	−53.1 ± 1.1	1.21 ± 0.02
	−60 mV	76.9 ± 0.9***	−52.0 ± 0.4**	135.0 ± 4.6***	−43.7 ± 1.3***	1.54 ± 0.04***
P16–19 (24)	−80 mV	89.7 ± 1.2	−60.2 ± 0.6	202.1 ± 3.5	−42.1 ± 1.4	1.63 ± 0.04
	−60 mV	87.1 ± 0.9**	−57.6 ± 0.5***	188.4 ± 4.0***	−46.5 ± 1.3***	1.52 ± 0.03***

Effect of the short-lasting depolarization on the waveform of the action potentials elicited during postnatal development. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Results

Sustained depolarization causes short-term plasticity of action potentials, as tested with short depolarizing pulses

The basic electrophysiological properties of CA1 pyramidal neurons vary widely during development (Spigelman *et al.* 1992; Sánchez-Alonso *et al.* 2012; see also Table 1). A particularly sensitive period of functional maturation of the rat hippocampus occurs around the time of eye opening at about 14 days. This critical age period coincides with the time at which rats begin to explore their environment more actively. To study the intrinsic excitability during this developmental period, we have examined the effect of depolarizing CA1 pyramidal neurons to a subthreshold potential in a pre-eye-opening group (P9–12 age) and a post-eye-opening group (P16–19 age). In current clamp recordings of CA1 pyramidal neurons, we compared the basic membrane properties when the membrane potential was held for 5 min at −60 mV (depolarized conditions) and −80 mV (control) and we found that some of the parameters tested were statistically different in both developmental periods (Table 1).

We then studied properties of the AP generated when the membrane potential was held at −60 mV and at −80 mV in both developmental groups. The classic view regarding the effects of membrane depolarization on voltage-dependent K⁺ channels is that at subthreshold voltages they can undergo a time-dependent inactivation. Subsequently, that inactivation should then increase the

spike width by decreasing the rate of repolarization of the AP (Mitterdorfer & Bean, 2002; Axmacher & Miles, 2004). In agreement with this idea, neurons belonging to the pre-eye-opening group showed a decrease in the repolarization rate (Table 2 and Fig. 1) followed by an increase in the half-width of APs (Table 2 and Fig. 1) when the APs were generated by a brief (5 ms) suprathreshold current pulse applied after 5 min of sustained depolarization at −60 mV. Conversely, when the same protocol was performed in P16–19 animals, an increase in the repolarization rate (Table 2 and Fig. 1) followed by a shortening of the half-width of the AP (Table 2 and Fig. 1) was observed. In addition to the effects on repolarization, both age groups showed a depolarization shift of the firing threshold and a decrease in the AP depolarization rate (see Table 2), probably due to the effect of a depolarization-dependent inactivation of Na⁺ channels (Hodgkin & Huxley, 1952; Carter & Bean, 2009). There was also an increase in the AP amplitude in the pre-eye-opening group that disappeared in the post-eye-opening group (Table 2), which could be an after effect of the previously mentioned changes in the repolarization of APs. In general, by plotting the time derivative of the voltage trajectory as a function of membrane potential, subtle differences in impulse waveform are appreciated more readily. Neurons in the pre-eye-opening group show an increase in the AP amplitude after sustained depolarization (Fig. 1*Bb*), in contrast to the P16–19 group (Fig. 1*Bd*). Furthermore, neurons belonging to the post-eye-opening group show larger early rate repolarization after

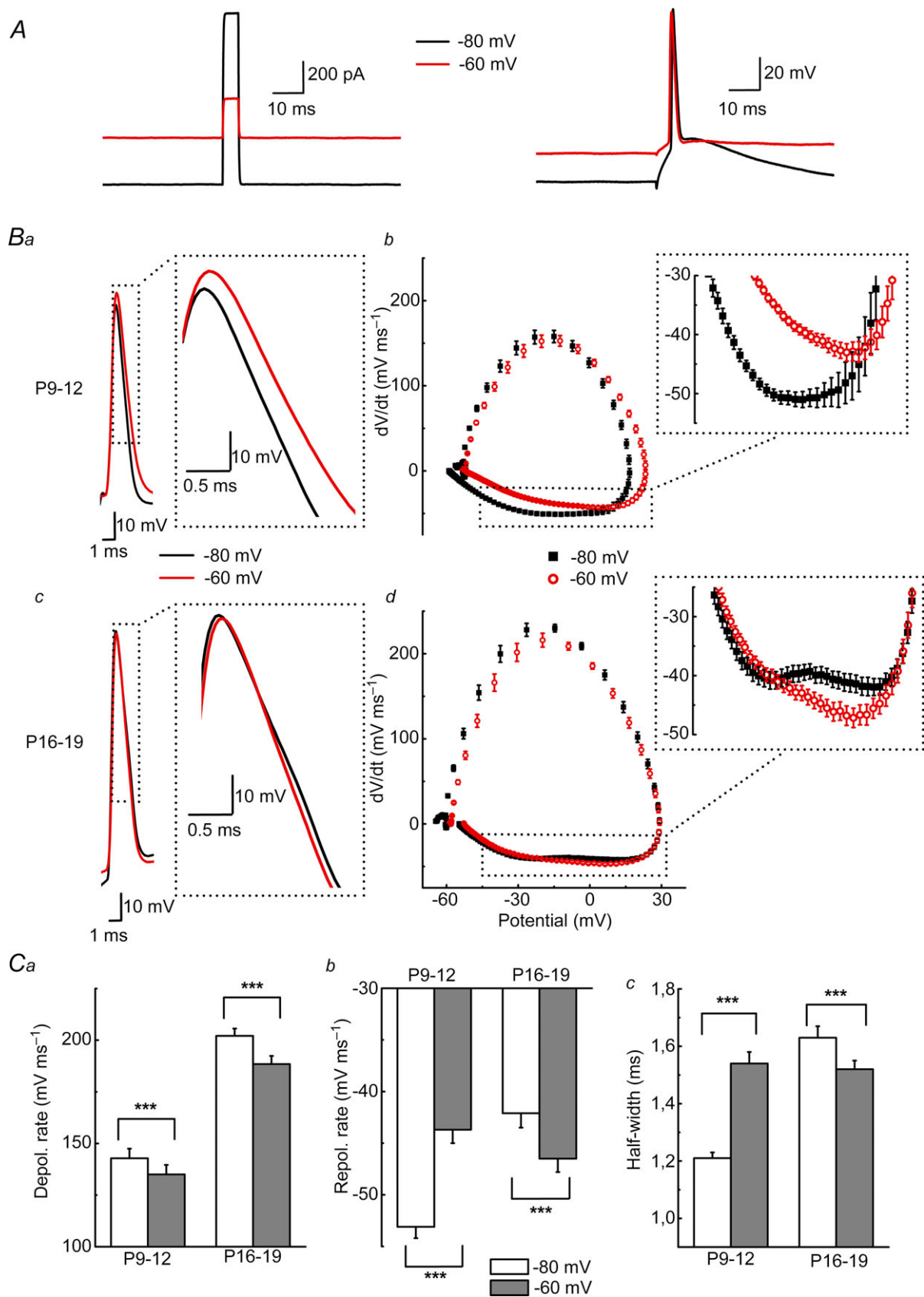


Figure 1. Sustained depolarization affects action potential (AP) waveform of CA1 pyramidal neurons

sustained depolarization (Fig. 1*Bd*), in contrast to the pre-eye-opening group (Fig. 1*Bb*). In summary, data from neurons recorded at the pre-eye-opening period are those expected taking in consideration the partial inactivation of the voltage-dependent K^+ channels at subthreshold voltages. However, in the post-eye-opening period changes in membrane excitability after short-term depolarization took the opposite direction. Therefore, our data suggest that developmental changes in membrane excitability are related to a homeostatic compensatory plasticity that reduces intrinsic excitability to balance membrane depolarization.

Sustained depolarization causes short-term plasticity of synaptically activated action potentials

We next sought to determine whether this short-term plasticity could also be observed when APs were evoked in response to an EPSP instead of somatic current injection. For this purpose, we stimulated the commissural/Schaffer collateral afferents to induce supra-threshold EPSPs in the post-eye-opening group in neurons where the membrane potential was held at -60 mV and -80 mV. Similar to somatic current injections, APs elicited at -80 mV presented longer half-width (-80 mV: 1.47 ± 0.03 ms; -60 mV: 1.40 ± 0.02 ms; $n = 22$; Paired t test; $P < 0.001$) and slower fast-repolarization rates (-80 mV: -47.15 ± 1.28 mV ms $^{-1}$; -60 mV: -52.04 ± 1.00 mV ms $^{-1}$; $n = 22$; Paired t test; $P < 0.001$) than those measured after holding the membrane for 5 min at -60 mV. Therefore, short-term plasticity of AP duration caused by sustained subthreshold depolarization was detected during both somatic current injection and synaptically induced EPSPs in CA1 pyramidal cells.

Action potential short-term plasticity caused by sustained subthreshold depolarization is cell-type specific

We also examined under current clamp the impact of sustained subthreshold depolarization on intrinsic excitability of CA1 interneurons and CA3 pyramidal neurons to check for cell-type specificity. Given the developmental expression profile of this form of

short-term plasticity, we focused only on neurons from the eye-opening group with ages ranging between 16 and 19 days old. In both CA3 pyramidal cells and CA1 interneurons, we found that the APs elicited at -80 mV presented shorter half-width and faster fast-repolarization rates than those measured after holding the membrane for 5 min at -60 mV (Fig. 2). Therefore, short-term plasticity of AP duration caused by sustained subthreshold depolarization is specifically expressed in CA1 pyramidal cells.

Temporal profile and reversibility of short-term intrinsic plasticity

To determine the minimal depolarization duration required to induce this new form of plasticity, we performed a set of experiments in which the APs were elicited after the cell was held at -80 mV for more than 5 min and after several depolarization durations (1, 15, 30, 60, 90, 180, 300, 450, 600 and 900 s) at -60 mV (see Fig. 3*A* for details). The AP parameters obtained in the pre-eye-opening group were similar regardless of the depolarization duration, where the half-width was longer (Fig. 3*B*) and the fast repolarization rate was slower than in controls (Fig. 3*B*). These results were those expected at this age where plasticity has not yet been fully established. However, in the P16–19 group, similar values were obtained for depolarization durations under 15 s, after which there was a steady decrease in the half-width and an increase in the repolarization rate (Fig. 3*C*), which plateau when the depolarization was held for more than 5 min (Fig. 3*C*). In summary, for depolarization durations shorter than 15 s the half-width was longer and the fast repolarization rate slower than controls in both age groups. In contrast, for longer depolarization durations, in the P16–19 group, the half-width was shorter and the fast repolarization rate faster than controls, while AP parameters remain unchanged in the P9–12 group. Remarkably, these results demonstrated that a simple 15 s depolarization was enough to induce a significant effect on the repolarization kinetics of the APs (Fig. 3*D*).

We next tested the time course of extinction of these plastic adaptations by comparing the half-width and repolarization rate values of APs elicited at different times

A, left, diagram of current clamp protocol used to elicit AP. Cells were held for 5 min at -60 mV or -80 mV before applying a short threshold depolarizing current pulse (5 ms). A, right, recorded spike traces obtained at -60 mV or -80 mV. *Ba* and *Bc*, representative traces of single spikes elicited at -60 mV or -80 mV from neurons at developmental stages: P9–12 (*Ba*) and P16–19 (*Bc*). The traces are overlaid to facilitate comparison. *Bb* and *Bd*, the average rates of membrane potential change are plotted vs. AP voltages when the membrane potential was held at -60 mV or -80 mV from neurons at both developmental stages: P9–12 (*Bb*) and P16–19 (*Bd*). Detail of repolarization phases is expanded to illustrate the differences. C, summary bar graphs comparing the depolarization rate (*Ca*), half-width (*Cb*) and repolarization rate (*Cc*) of the APs obtained when the membrane potential was held at -60 mV with those observed at -80 mV at both developmental stages. Note how sustained depolarization modifies some AP properties depending on the postnatal age. P9–12: $n = 36$; P16–19: $n = 24$ *** $P < 0.001$ (-60 mV vs. -80 mV).

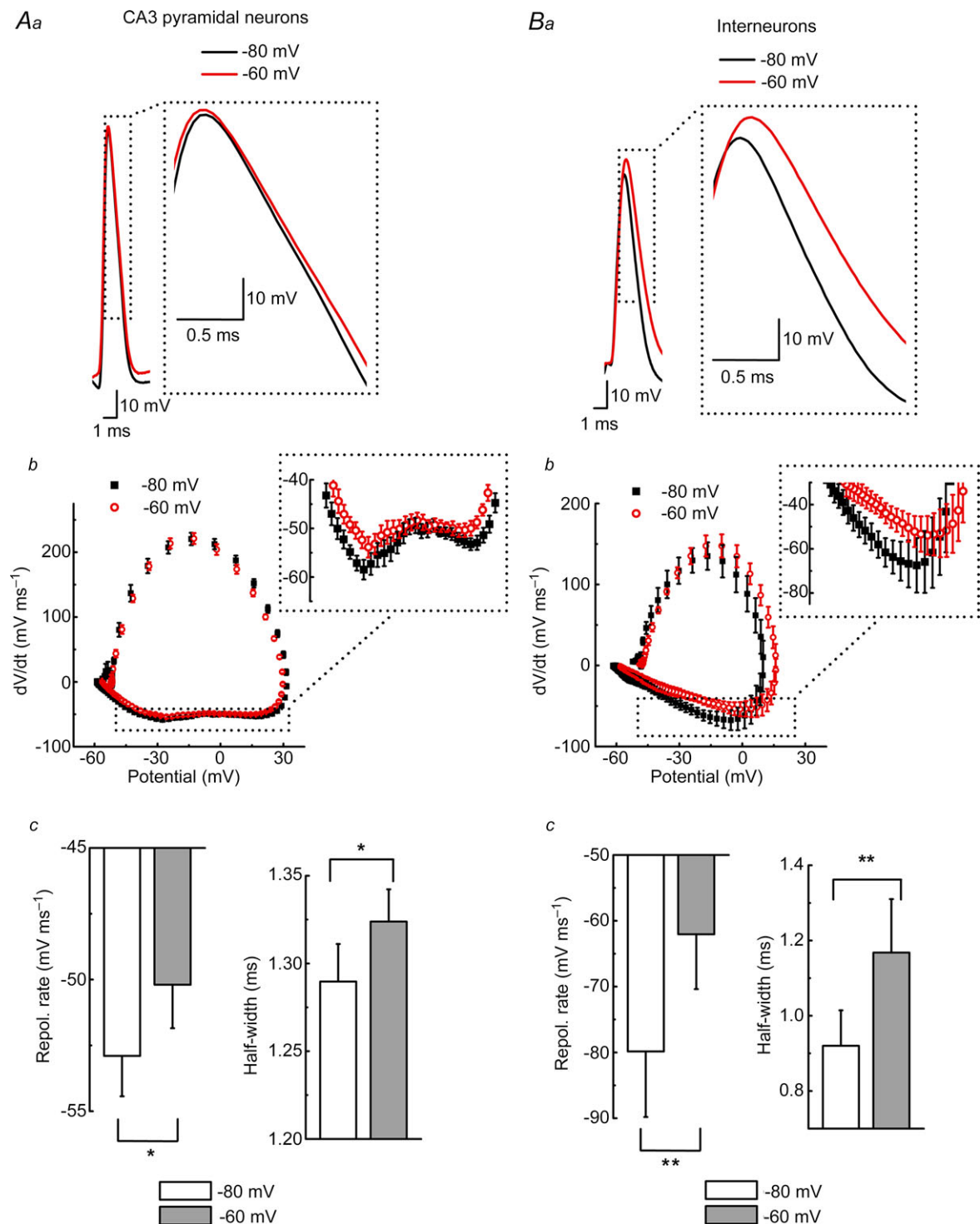


Figure 2. Sustained depolarization does not affect action potential (AP) waveform of CA3 pyramidal cells and CA1 interneurons

Aa and *Ba*, cells were held for 5 min at -60 mV or -80 mV before applying a short threshold depolarizing current pulse (5 ms). Representative traces of single spikes elicited at -60 mV or -80 mV from CA3 pyramidal neurons (*Aa*) and CA1 interneurons (*Ba*) at developmental stages of P16–19. The traces are overlaid to facilitate comparison. *Ab* and *Bb*, the average rates of membrane potential change are plotted vs. AP voltages when the membrane potential was held at -60 mV or -80 mV from CA3 pyramidal neurons (*Ab*) and CA1 interneurons (*Bb*). Detail of the repolarization phase is expanded to illustrate the differences. *Ac* and *Bc*, summary bar graphs comparing AP half-width and repolarization rate obtained when the membrane potential was held at -60 mV

(from 1 to 900 s) after the membrane potential returned to -80 mV with those obtained when the plasticity was maximum (depolarization period of 5 min at -60 mV, control) (see Fig. 4A for details). In the pre-eye-opening group, the half-width was shorter and the repolarization rate faster immediately after hyperpolarization to -80 mV, where the extent of these changes was similar regardless of the hyperpolarization duration (Fig. 4B). However, the P16–19 group only showed a shorter half-width and faster repolarization rate after 1 s hyperpolarization, probably due to the remaining effects of the plasticity added to the deinactivation of voltage-dependent K^+ channels (Fig. 4C). After this initial increase in repolarization kinetics, the magnitude of the plasticity decreased with the hyperpolarization duration and was mostly extinguished at 180 s (Fig. 4C and D).

The short-term intrinsic plasticity alters the excitability of CA1 pyramidal neurons

To explore whether short-term intrinsic plasticity alters membrane excitability, we tested the ability of CA1 pyramidal neurons to generate APs in response to long somatic current steps (1 s) when the membrane potential was held for more than 5 min at -60 mV and -80 mV. The input–output curves were built taking into consideration that the membrane potential at -60 mV is closer to the threshold than at -80 mV. To avoid this difference, we used the current added to the threshold step as the input (suprathreshold intensity). The input–output curves show that less current is required to generate the same number of APs at -60 mV than at -80 mV in both age groups (Fig. 5A). This result could be related to the differences in basic membrane properties, taking into consideration that input membrane resistance at -60 mV is much higher than at -80 mV (Table 1). To compensate for the resistance differences, we plotted the input–output curves versus the theoretical steady-state membrane potential for each depolarizing current step derived from Ohm's law (Fig. 5B). Once normalized, we found that the neurons belonging to the pre eye-opening group presented similar input/output profiles regardless of the baseline holding potential (Fig. 5Bc). Interestingly, the post-eye-opening group reflected smaller maximal AP frequencies when the baseline membrane was held at -60 mV than at -80 mV (Fig. 5Bd). Moreover, the maximal AP frequencies generated by the younger animals were smaller than in those of the older animals in both kinds of input–output curves (Fig. 5A and B).

We also tested the effects of the intrinsic plasticity on the ability to generate APs in response to short somatic

current pulses (5 ms). For this purpose, we delivered short trains of 10 pulses at 10 Hz using $1.1\times$ threshold current steps on CA1 pyramidal cells held at -80 mV and -60 mV (Fig. 6A). Under these conditions, the ability to generate APs in the pre-eye-opening group was lower when the baseline membrane potential was held at -80 mV than at -60 mV (-60 mV: 7.40 ± 0.48 vs. -80 mV: 5.78 ± 0.62 successful pulses; $n = 24$; paired t test; $P < 0.05$; Fig. 6C). Conversely, the post-eye-opening group showed an increased number of successful pulses when the neuron was held at -80 mV than at -60 mV baseline voltage (-60 mV: 4.52 ± 0.29 vs. -80 mV: 5.94 ± 0.36 successful pulses; $n = 16$; paired t test; $P < 0.001$; Fig. 6C), which fits well with the plastic increase in the repolarization rate of the APs and with the threshold changes observed under these conditions. As a whole, our results reveal that sustained subthreshold depolarization decreases the excitability as measured by the number of APs in response to both long and short somatic current pulses.

The induction of short-term intrinsic plasticity is Ca^{2+} dependent

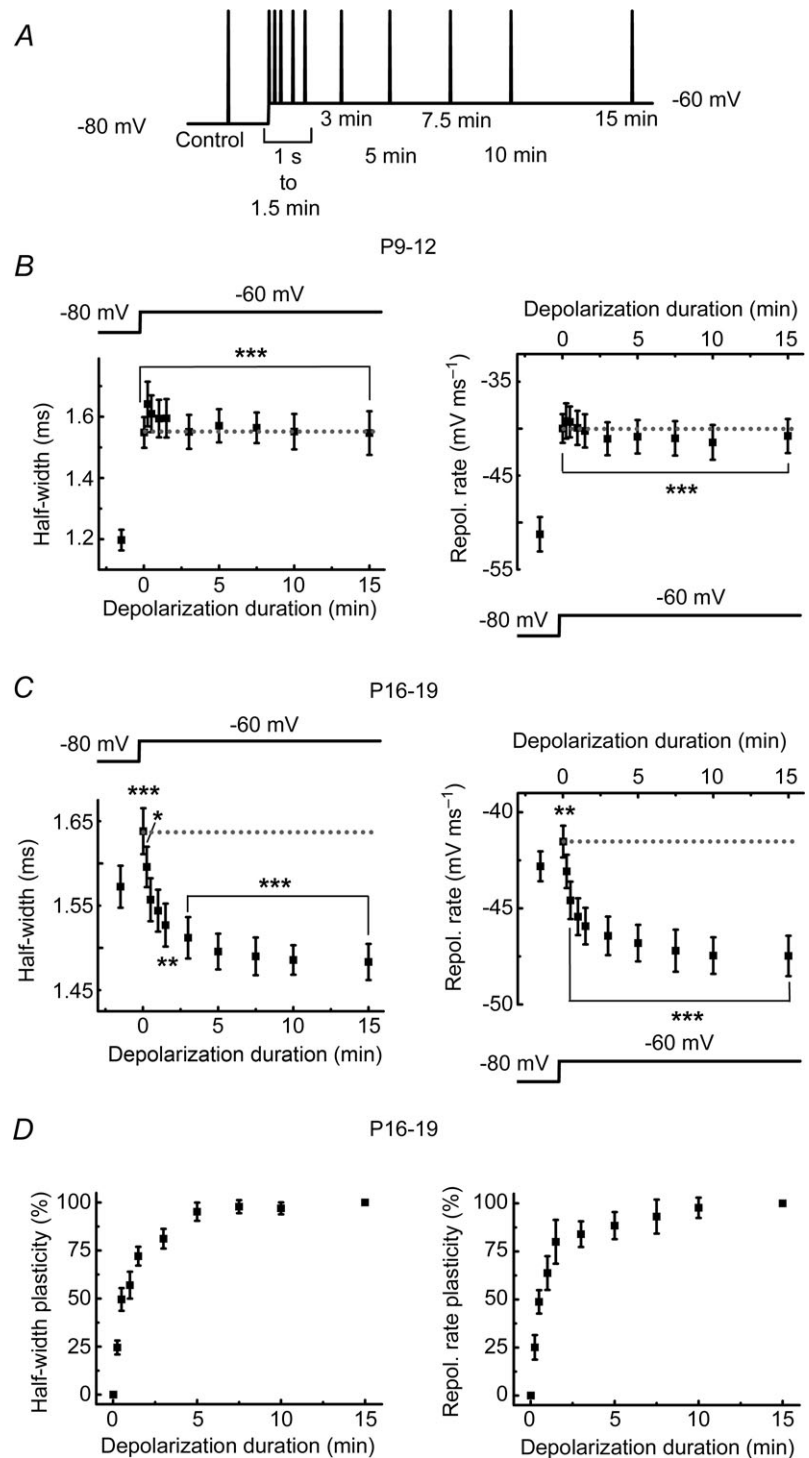
Having identified a novel form of intrinsic plasticity in CA1 neurons, we sought to investigate the potential mechanisms involved in the depolarization-induced decrease of excitability observed in post-eye-opening animals. First, we tested the potential involvement of intracellular Ca^{2+} on this plasticity, as it has been shown that other forms of intrinsic plasticity are Ca^{2+} -dependent (Grubb & Burrone, 2010; O'Leary *et al.* 2010). To test this hypothesis, cells were loaded with different Ca^{2+} chelators through a patch pipette. We found that while this plasticity was evident in the presence of EGTA (10 mM), as shown in the experiments described above where this chelator was usually added to the internal solution (see Methods), the effects of the short-term intrinsic plasticity on the AP waveform (the half-width was $3.94 \pm 1.63\%$ longer and repolarization rate $4.08 \pm 1.63\%$ slower at -60 mV than -80 mV, $n = 18$; Fig. 7Aa,b) and excitability ($n = 9$; Fig. 7Ac–Af) were blocked by the fast Ca^{2+} buffer BAPTA (10 mM), indicating that the induction process is Ca^{2+} -dependent and that the Ca^{2+} sensor must be close to the site of Ca^{2+} entry (Fakler & Adelman, 2008).

To test the Ca^{2+} source involved in this plasticity, we performed experiments in the presence of different blockers of well-established Ca^{2+} sources in CA1 pyramidal neurons that can become activated at sub-threshold membrane potentials. In neurons, Ca^{2+} flux through *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors is

with those observed at -80 mV from CA3 pyramidal neurons (Ac) and CA1 interneurons (Bc) at developmental stages of P16–19. CA3 pyramidal neurons: $n = 9$; CA1 interneurons: $n = 11$ * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (-60 mV vs. -80 mV).

thought to be critical in synaptic and intrinsic plasticity, (Malenka & Bear, 2004; Fan *et al.* 2005). Considering that background synaptic activity is usually very low in our recording conditions and that the induction of the plasticity described here was performed at subthreshold potentials that could not evoke polysynaptic events on the circuit, we expected the NMDA not to play a role. As was

predicted, we found that blocking the NMDA receptors with D-2-amino-5-phosphonopentanoate ($50 \mu\text{M}$) did not affect the cell ability to express plasticity (the half-width was $4.21 \pm 1.03\%$ shorter and the repolarization rate $8.19 \pm 1.25\%$ faster at -60 mV than -80 mV , $n = 18$; Fig. 7*Ba,b*). The other Ca^{2+} influx source that could provide a signal for plasticity induction within



a cell are voltage-gated Ca^{2+} channels, especially the members of the Ca_v3 family or T-type channels, which operate at membrane potentials that are subthreshold to AP generation. To test this hypothesis, we added the T-type Ca^{2+} channel blocker nickel (0.5 mM) to our external solution to neurons that previously expressed the plasticity. Under these conditions, we found that the

effects of the short-term intrinsic plasticity on the AP waveform (the half-width was $5.47 \pm 1.05\%$ longer and the repolarization rate $5.63 \pm 1.11\%$ slower at -60 mV than -80 mV, $n = 18$; Fig. 7*Ca,b*) and excitability ($n = 11$; Fig. 7*Cd,e*) were blocked, suggesting that T-type channels were the source of Ca^{2+} involved in this plasticity. Similar results were found when $10 \mu\text{M}$ mibefradil was

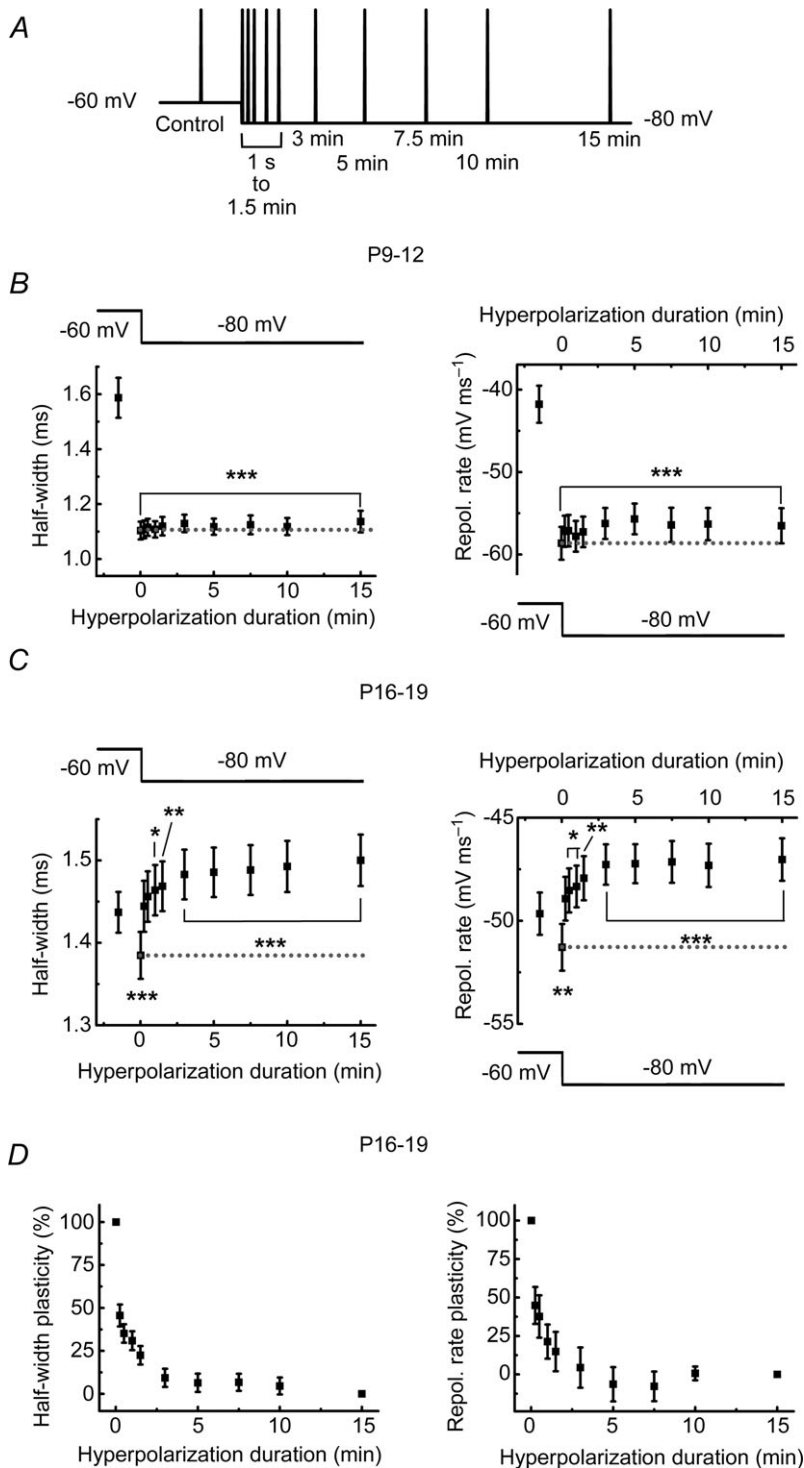


Figure 4. Temporal profile of the short-term intrinsic plasticity disappearing process

A, diagram of current-clamp protocol used to study the temporal profile of the disappearing process. Cells were held at -60 mV for 5 min before the membrane potential returned to -80 mV. The APs were elicited by a 5 ms pulse applied after the cell was held at -60 mV for more than 300 s and after different hyperpolarization durations: 1, 15, 30, 60, 90, 180, 300, 450, 600 and 900 s. **B** and **C**, graphs showing the average of the spike half-width and repolarization rate of the AP plotted vs. the hyperpolarization durations from neurons at developmental stages: P9–12 (**B**) and P16–19 (**C**). Note how both parameters are modified with the duration of the hyperpolarization only at P16–19. The dotted line shows the baseline level. **D**, graphs showing the mean percentage plasticities of the half-width and the repolarization rate plotted against the hyperpolarization durations at P16–19. Note how the magnitude of the plasticity decreases with an increase in hyperpolarization duration. P9–12: $n = 16$; P16–19: $n = 21$ * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. (each value at -80 mV vs. control)

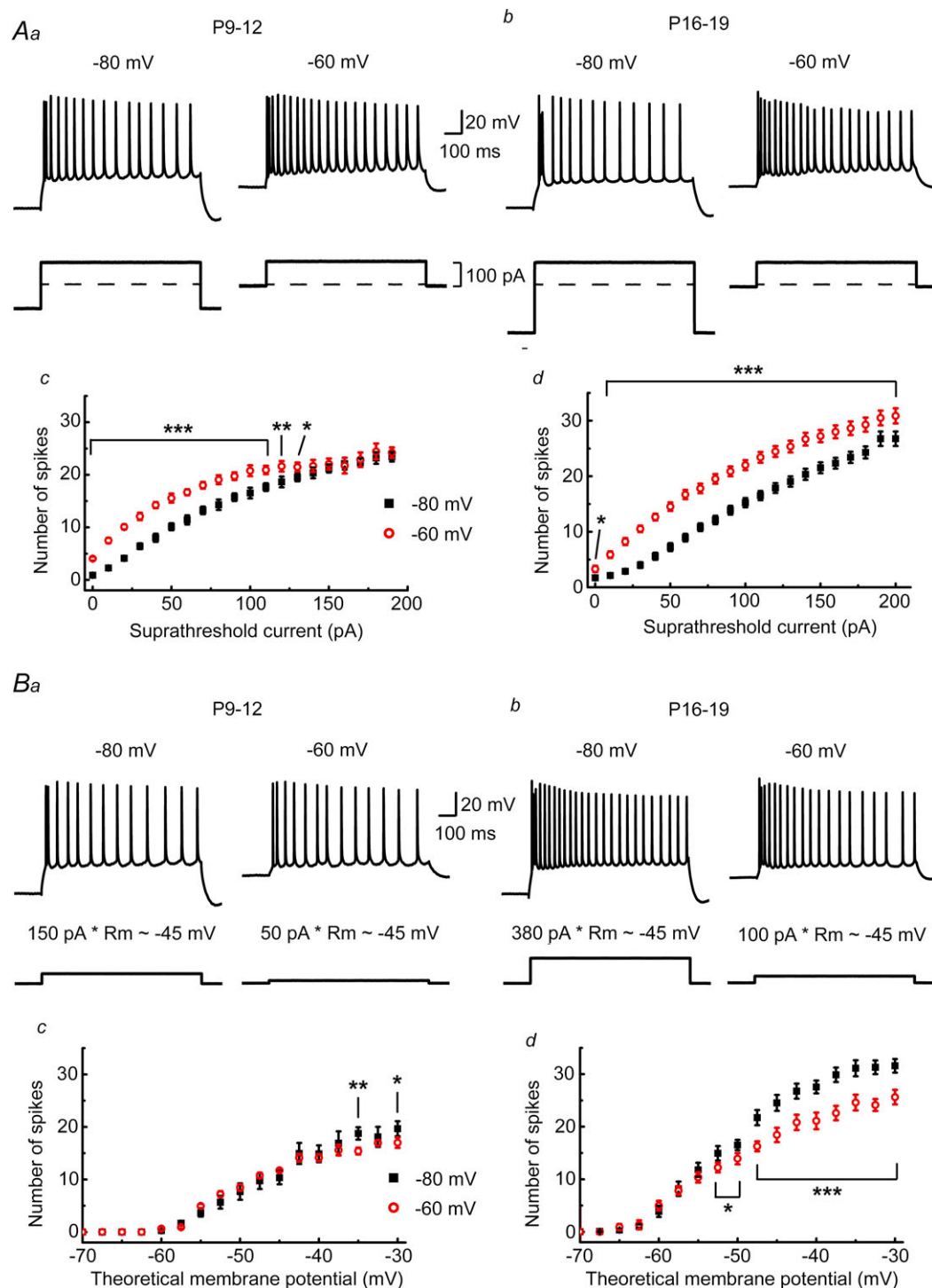


Figure 5. Short-term intrinsic plasticity decreases neuronal excitability in response to long current pulses

A, to avoid the difference in baseline membrane potential, input–output curves are plotted *versus* the suprathreshold current intensity (i.e. the current added to the threshold current). **Aa** and **Ab**, example of current clamp traces of the spike generation in response to 1 s depolarizing current pulse, when the membrane potential was held for 5 min at -60 mV or -80 mV in neurons of developmental stages: P9–12 (**Aa**) and P16–19 (**Ab**). The dashed line in the current step examples shows the suprathreshold intensity. **Ac** and **Ad**, mean number of action potentials elicited by 1 s pulses at different suprathreshold current intensities at developmental stages: P9–12 (**Ac**) ($n = 27$ cells, the neuronal excitability at -80 mV vs. -60 mV, was significantly lower between 0 and 130 pA) and P16–19 (**Ad**) ($n = 17$ cells, the neuronal excitability at -80 mV was significantly lower than at -60 mV for all the suprathreshold currents). **B**, to avoid the differences in basic membrane properties (-80 mV vs. -60 mV),

applied instead of nickel to block T-type Ca^{2+} channels (the half-width was $11.51 \pm 5.48\%$ longer and the repolarization rate $13.95 \pm 7.87\%$ slower at -60 mV than -80 mV, $n = 6$). We performed a set of experiments in five cells before and after the addition of nickel to the extracellular fluid, in order to compare the AP changes during plasticity induction with those obtained when it is blocked by nickel. The half-width was longer from 1 s to beyond in the presence of nickel (Fig. 7C; $n = 5$).

The expression mechanisms of short-term intrinsic plasticity

Considering that the A-current (I_A) is an outward transient current activated at subthreshold potentials (Mitterdorfer & Bean, 2002) that contributes to AP repolarization and modulates the frequency of repetitive firing (Connor & Stevens, 1971; Storm, 1987), which are affected by the plasticity studied here, we have analysed whether I_A is involved in the expression of this intrinsic plasticity. To test that, we added the A-type K^+ current blocker 4-aminopyridine (3 mM) to the extracellular fluid and found that it effectively blocked plasticity (Fig. 8A) in neurons that had previously expressed it.

To better study the role of the A-type current on this plasticity, we performed a new set of experiments that allowed us to study this mechanism in isolation on post-eye-opening aged animals. Owing to the fast kinetics of the current, we performed voltage clamp recordings on acutely dissociated CA1 pyramidal neurons to improve the space clamp properties of the recording. To isolate I_A , we added the following to the extracellular solution: TTX ($0.5 \mu\text{M}$) to block voltage-dependent Na^+ currents and nifedipine ($10 \mu\text{M}$) to block the L-type Ca^{2+} current. The I_A was obtained by subtracting the current elicited with a 150 ms prepulse of -20 mV, which removes the initial transient current leaving a slowly inactivating current, from those elicited from -120 mV, which contain all K^+ currents (Connor & Stevens, 1971; Numann *et al.* 1987; Klee *et al.* 1995; Mitterdorfer & Bean, 2002) (Fig. 8Ba). Following this protocol, we found that the peak current was significantly higher when the cells were pre-held to -60 mV (-60 mV: 5.12 ± 0.30 nA, $n = 11$; -80 mV:

4.22 ± 0.24 nA, $n = 11$, paired *t* test; $P < 0.001$; Fig. 8Bb,c). Furthermore, the inactivation time constant of I_A at the pre-holding potential of -60 mV was significantly slower (-60 mV: 63.86 ± 7.31 ms, $n = 11$; -80 mV: 53.04 ± 5.33 ms, $n = 11$, paired *t* test; $P < 0.001$; Fig. 8Bd), which stressed the importance of I_A as the current involved in the intrinsic plasticity described here. Furthermore, as T-type channels are the source of Ca^{2+} involved in the expression of this plasticity, we evaluated the potential involvement of these channels in the increment of I_A by applying nickel (0.5 mM) to the extracellular fluid and found that the differences in the peak current and time constant observed between both pre-holding potentials disappeared (Fig. 9A).

It has been reported that KChIP₃ functions as a Ca^{2+} sensor to modulate the voltage-dependent inactivation of $\text{K}_v4.2$ -encoded I_A in response to the entry of Ca^{2+} through Ca_v3 calcium (T-type) channels (Anderson *et al.* 2010, 2013). We tested the potential role of KChIP₃ in our short-term intrinsic plasticity, considering that A-type and T-type currents are activated and inactivated at subthreshold voltage ranges and that both are involved in the short-term intrinsic plasticity reported here. We used an anti-KChIP₃ antibody applied through patch pipette to interfere with the ability of KChIP₃ to act as calcium sensor for modulation of $\text{K}_v4.2$ channels. We found that the addition of an anti-KChIP₃ antibody (1:100) to the intracellular solution blocked the intrinsic plasticity changes observed in the AP parameters and excitability (Fig. 9B). This defines a signalling pathway where the entry of calcium through T-type Ca^{2+} channels activates KChIP₃ and therefore decreases the excitability of the neurons subject to sustained subthreshold depolarizations. To understand further how this short-term intrinsic plasticity develops, we analysed the $\text{Ca}_v3.2/\text{K}_v4.2$ ratio by Western blot in hippocampal extracts from rats before and after the eye-opening period. We found that the $\text{Ca}_v3.2/\text{K}_v4.2$ ratio was 27% higher in the post eye-opening group (Fig. 9C). This $\text{Ca}_v3.2/\text{K}_v4.2$ increase was mainly driven by an age-dependent decrease of $\text{K}_v4.2$ expression (Fig. 9C). This would explain the faster repolarization kinetics observed in the pre-eye-opening group under control conditions (Table 2). In addition, the higher $\text{Ca}_v3.2/\text{K}_v4.2$ ratio in P17 animals suggests a higher modulation of the $\text{K}_v4.2$ channels by $\text{Ca}_v3.2$ channels and consequently a higher

input–output curves are plotted versus the theoretical steady-state membrane potential (i.e. the steady-state membrane potential given by Ohm's law) for each depolarizing current step. Ba and Bb, example of the spike generation in response to 1 s depolarizing current pulses, when the membrane potential was held during 5 min at -60 mV or -80 mV, in neurons of developmental stages: P9–12 (Ba) and P16–19 (Bb). The four current steps of the example traces depolarize the membrane potential at -45 mV (theoretical steady state). Bc and Bd, mean number of action potentials elicited by 1 s current steps versus the theoretical membrane potential values given at developmental stages: P9–12 (Bc) ($n = 27$ cells, the neuronal excitability at -80 mV vs. -60 mV was significantly higher at -35 and -30 mV) and P16–19 (Bd) ($n = 17$ cells, the neuronal excitability at -80 mV vs. -60 mV, was significantly higher from -52.5 to -30 mV). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (-80 mV vs. -60 mV).

Ca^{2+} -dependent modulation of the A-current. Therefore, we propose that the higher $\text{Ca}_v3.2/\text{K}_v4.2$ ratio could be considered an indicator of short-term intrinsic plasticity maturation.

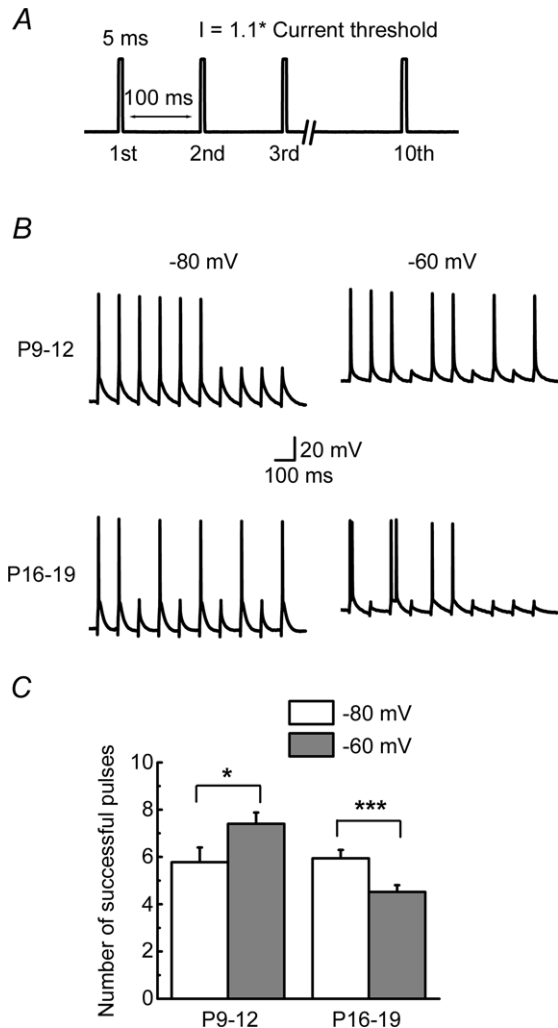


Figure 6. Short-term intrinsic plasticity decreases neuronal excitability in response to short current pulses

A, diagram of current clamp protocol used to study neuronal excitability in response to short somatic current pulses (5 ms). Action potentials were elicited by 10 pulses applied every 100 ms, at 1.1 threshold current from baseline potentials of -80 mV and -60 mV. B, example of current clamp traces of the spike generation in response to 10 depolarizing current pulses, when membrane potential was held at -60 mV and at -80 mV in neurons at developmental stages P9–12 and P16–19. C, summary bar graph comparing the number of successful pulses obtained at membrane potential held at -60 mV with those observed at -80 mV from developmental stages P9–12 ($n = 24$ cells, the neuronal excitability at -80 mV was significantly lower than at -60 mV) and P16–19 ($n = 16$ cells, the neuronal excitability at -80 mV was significantly higher than at -60 mV). * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ (-80 mV vs. -60 mV).

Discussion

We have identified a novel form of short-term intrinsic plasticity in hippocampal CA1 pyramidal neurons that reduces neural excitability when the resting potential is brought closer to the firing threshold. This form of homeostatic plasticity might help the pyramidal neurons of CA1 to prevent increases in activity that might lead to excessive firing. Plasticity induction is due to sustained sub-threshold depolarization of the membrane, taking place after the eye-opening period. In addition, it is cell-type specific, as it is not induced in CA3 pyramidal neurons or in hippocampal interneurons in post-eye-opening animals. Furthermore, the induction of this plasticity is Ca^{2+} -dependent, getting the Ca^{2+} from T-type Ca^{2+} channels; its Ca^{2+} sensor is KChIP₃, which modulates the I_A .

Ca^{2+} is involved in the induction of almost all forms of short- and long-term synaptic and intrinsic plasticities (Lynch *et al.* 1983; Malenka *et al.* 1988; Aizenman & Linden, 2000; Fan *et al.* 2005; O'Leary *et al.* 2010). Furthermore, it has recently been observed that sustained depolarization, lasting up to several days, induces a Ca^{2+} -dependent reduction in intrinsic excitability in primary hippocampal cultures (O'Leary *et al.* 2010) and in neurons of the medial nucleus of the trapezoid body (Tong *et al.* 2010). Several lines of evidence suggest that the short-term intrinsic plasticity described here is Ca^{2+} -dependent: (1) this plasticity is blocked when neurons were loaded with BAPTA (Fig. 7A), but not when they were loaded with EGTA, indicating that the induction process is Ca^{2+} -dependent and their Ca^{2+} sensor should be close to the site of Ca^{2+} entry (that is, in a nanodomain) (Fakler & Adelman, 2008); (2) this plasticity is blocked by applying a T-type blocker, but not by applying a NMDA-antagonist, indicating that Ca^{2+} flows in through T-type Ca^{2+} channels (Fig. 7B); (3) the increase in I_A and its differences in time constants between -60 mV and -80 mV pre-holding potentials disappear by applying nickel, further supporting the potential involvement of T-type channels in the expression of this plasticity (Fig. 9A); (4) the intracellular presence of an anti-KChIP₃ antibody blocks intrinsic plasticity, indicating that KChIP₃ is a Ca^{2+} sensor for this plasticity (Fig. 9B), since Anderson *et al.* (2010) demonstrated that KChIP₃ modulates the voltage dependence of inactivation of $\text{K}_v4.2$ -encoded I_A in response to Ca^{2+} entry through Ca_v3 channels. Consequently, the increased activity of the A-type K^+ current leads to a shortening of the AP width by means of an increase in the fast-repolarization rate (Fig. 1), which culminates in a reduction of neuronal excitability (Figs 5 and 6). However, we cannot exclude the presence of other intermediate components or enzymatic modulators in the signalling pathway described here. Moreover, there might be other additional mechanisms by

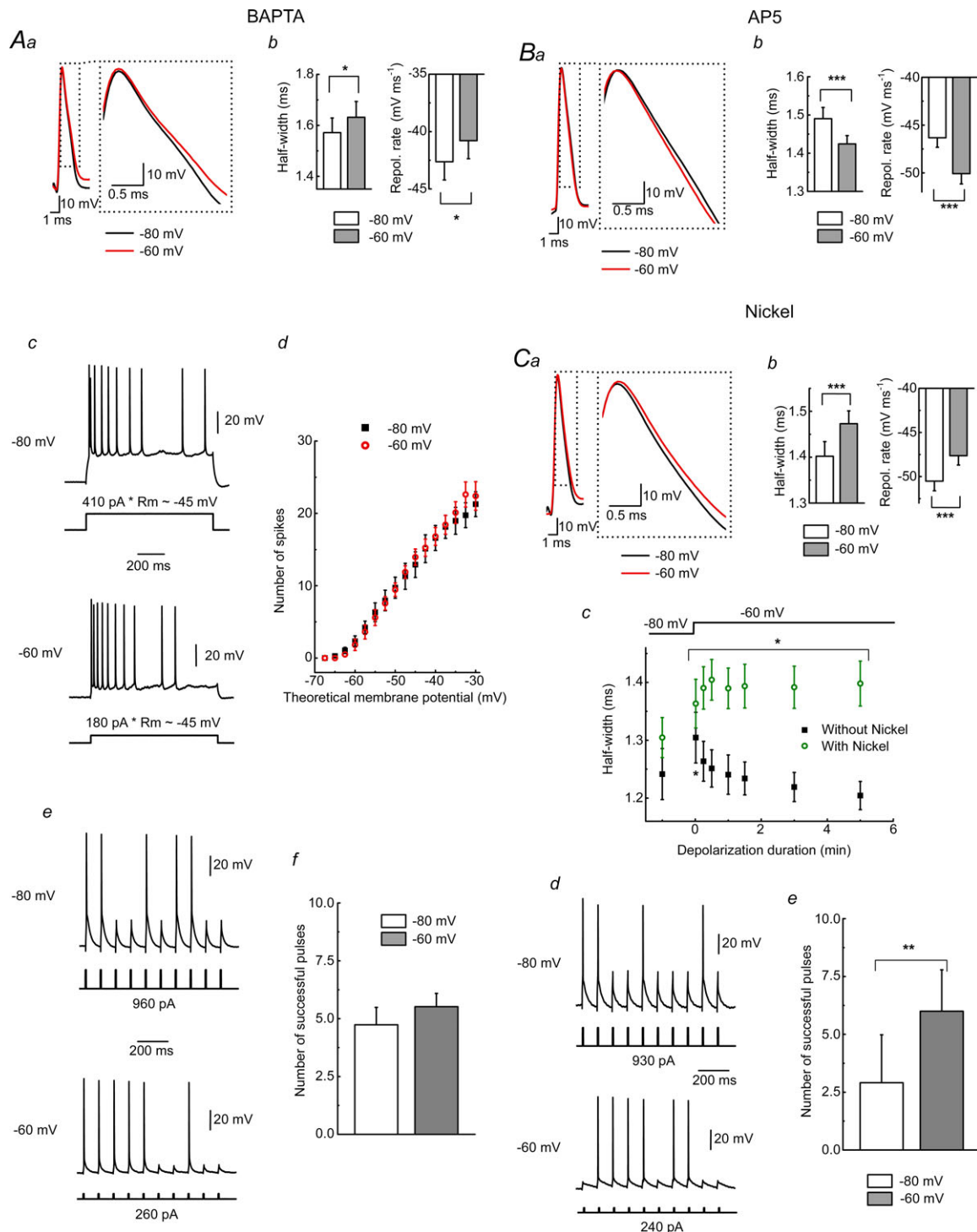


Figure 7. Induction of the short-term intrinsic plasticity is calcium-dependent

Aa, representative traces of single spikes elicited by brief threshold depolarizing current pulses at -60 mV or -80 mV, in the presence of intracellular BAPTA (10 mM). **Ab**, summary bar graphs comparing the half-width and the repolarization rate of the action potentials (APs) obtained when the membrane potential was held at -60 mV with those observed at -80 mV in the presence of BAPTA ($n = 18$ cells). Note that in the presence of BAPTA the change on AP half-width and repolarization rate was opposite to that in control conditions. **Ac**, example of current clamp traces of the spike generation in response to 1 s depolarizing current pulse, which depolarizes the membrane potential at -45 mV, when membrane potential was held at -80 mV (up) or -60 mV (down) in the presence of intracellular BAPTA. **Ad**, mean number of APs elicited by 1 s current steps versus the theoretical membrane potential in the presence of intracellular BAPTA ($n = 9$ cells). **Ae**, example of current clamp traces of

which subthreshold (or suprathreshold) depolarizations might induce adaptations to prevent excessive activity. For instance, other Ca^{2+} sources could play a role under physiological conditions in which the increased depolarization does not remain subthreshold. Under these conditions, the role of high-threshold voltage-gated Ca^{2+} channels such as L-type on the excitability modulation could not be excluded. In agreement with this possibility, homeostatic studies in which high concentrations of K^+ have been used have shown the importance of L-type Ca^{2+} channels in the reduction of excitability by either increasing the repolarization of the AP (O'Leary *et al.* 2010) or by altering the firing threshold by modifying the location of the initial segment of the axon (Grubb & Burrone, 2010). However, the time scale of these studies (days of high K^+ -induced activity) is quite different to the results described here (seconds to minutes) and specific experiments should be performed to test this possibility.

This novel form of intrinsic plasticity is induced by depolarization durations from 15 s to several minutes. This induction duration could be explained by a persistent Ca^{2+} entry at -60 mV, due to a persistent Ca^{2+} current and/or interplay between activation and voltage- and time-dependant inactivation of the Ca_v3 channels. In fact, the inactivation time constant for T-type Ca^{2+} current was much longer at more hyperpolarized membrane potentials (Takahashi *et al.*, 1991; Thompson & Wong, 1991; Sánchez-Alonso *et al.* 2010). However, relations between the depolarization duration and the degree of plasticity may not be completely explained by properties of the T-type Ca^{2+} current and remain a matter for future studies.

Changes in AP parameters obtained by sustained depolarization occurred at the falling phase, and are suggestive of modulation of the inactivation and/or

removal of the inactivation of K^+ currents, which are important for AP repolarization (Storm, 1987; Mitterdorfer & Bean, 2002). In addition to AP repolarization, I_A contributes to the spike frequency (Connor & Stevens, 1971; Johnston *et al.* 2000; Jerng *et al.* 2004; Kim *et al.* 2005), which is also modulated by the intrinsic plasticity described here. We have also shown that an A-type K^+ current is involved in this plasticity by testing its modulation by subthreshold depolarizations (Fig. 8B) and by blocking the plasticity with the A-type K^+ current blocker 4-aminopyridine (Fig. 8A). However, at the concentrations used in our study, 4-aminopyridine also blocks D-type K^+ currents. Furthermore, the D-type K^+ currents have different inactivation kinetics to A-type K^+ currents, meaning that the isolation protocol used to measure the A-type current may not rule out a possible role of a D-type K^+ current. However, an important point against involvement of a D-type K^+ current comes from the dependence of the intrinsic plasticity described here on the presence of the Ca^{2+} sensor KChIP₃. We have shown that blocking the effects of KChIP₃ with antibodies applied through a patch pipette is enough to prevent the induction of plasticity (Fig. 9B). Previous reports have shown that KChIP₃ selectively binds to members of the $\text{K}_v4.x$ family of K^+ channels (Gutman *et al.* 2005; Pongs & Schwarz, 2010), which greatly reduces possible involvements of other K^+ channels with no affinity for KChIP₃. Furthermore, unlike KChIP₃, the auxiliary subunits $\text{K}_v\beta$, which bind intracellularly to D-type K^+ channels, lack Ca^{2+} -binding domains (Pongs & Schwarz, 2010).

From the three components of the intrinsic plasticity mechanism, $\text{Ca}_v3.2$ -KChIP₃- $\text{K}_v4.2$, current findings (Fig. 9C) suggest that the expression of this plasticity is highly dependent on the percentage of $\text{K}_v4.2$ channels modulated by $\text{Ca}_v3.2$ channels. This percentage increased

the spike generation in response to 10 brief depolarizing current pulses, when membrane potential was held at -80 mV (up) or -60 mV (down) in the presence of intracellular BAPTA. *Af*, summary bar graph comparing the number of successful pulses obtained when the membrane potential was held at -60 mV with those observed at -80 mV in the presence of intracellular BAPTA ($n = 9$ cells). Note that in the presence of BAPTA the neuronal excitability was similar at -80 mV and -60 mV. *Ba*, representative traces of single spikes elicited by brief threshold depolarizing current pulses at -60 mV or -80 mV, in the presence of extracellular AP5 ($50 \mu\text{M}$). *Bb*, summary bar graphs comparing the half-width and the repolarization rate of the APs obtained when the membrane potential was held at -60 mV with those observed at -80 mV in the presence of AP5 ($n = 18$ cells). *Ca*, representative traces of single spikes elicited by brief threshold depolarizing current pulses at -60 mV or -80 mV, in the presence of extracellular nickel ($500 \mu\text{M}$). *Cb*, summary bar graphs comparing the half-width and the repolarization rate of the APs obtained when the membrane potential was held at -60 mV with those observed at -80 mV in the presence of extracellular nickel ($500 \mu\text{M}$) ($n = 18$ cells). Note that in the presence of nickel the change in AP half-width and repolarization rate was opposite to that in control conditions. *Cc*, graphs showing the average of the spike half-width of the AP plotted vs. the depolarization durations, in the presence and absence of extracellular nickel ($500 \mu\text{M}$; $n = 5$). Note how the half-width changes with increasing depolarization durations were the opposite after blocking the plasticity with nickel. *Cd*, example of current clamp traces of the spike generation in response to 10 brief depolarizing current pulses, when membrane potential was held at -80 mV (up) or at -60 mV (down) in the presence of extracellular nickel. *Ce*, summary bar graph comparing the number of successful pulses obtained when the membrane potential was held at -60 mV with those observed at -80 mV in the presence of extracellular nickel ($n = 11$ cells). The neuronal excitability was lower at -80 mV than -60 mV. $*P < 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$ (-80 mV vs. -60 mV).

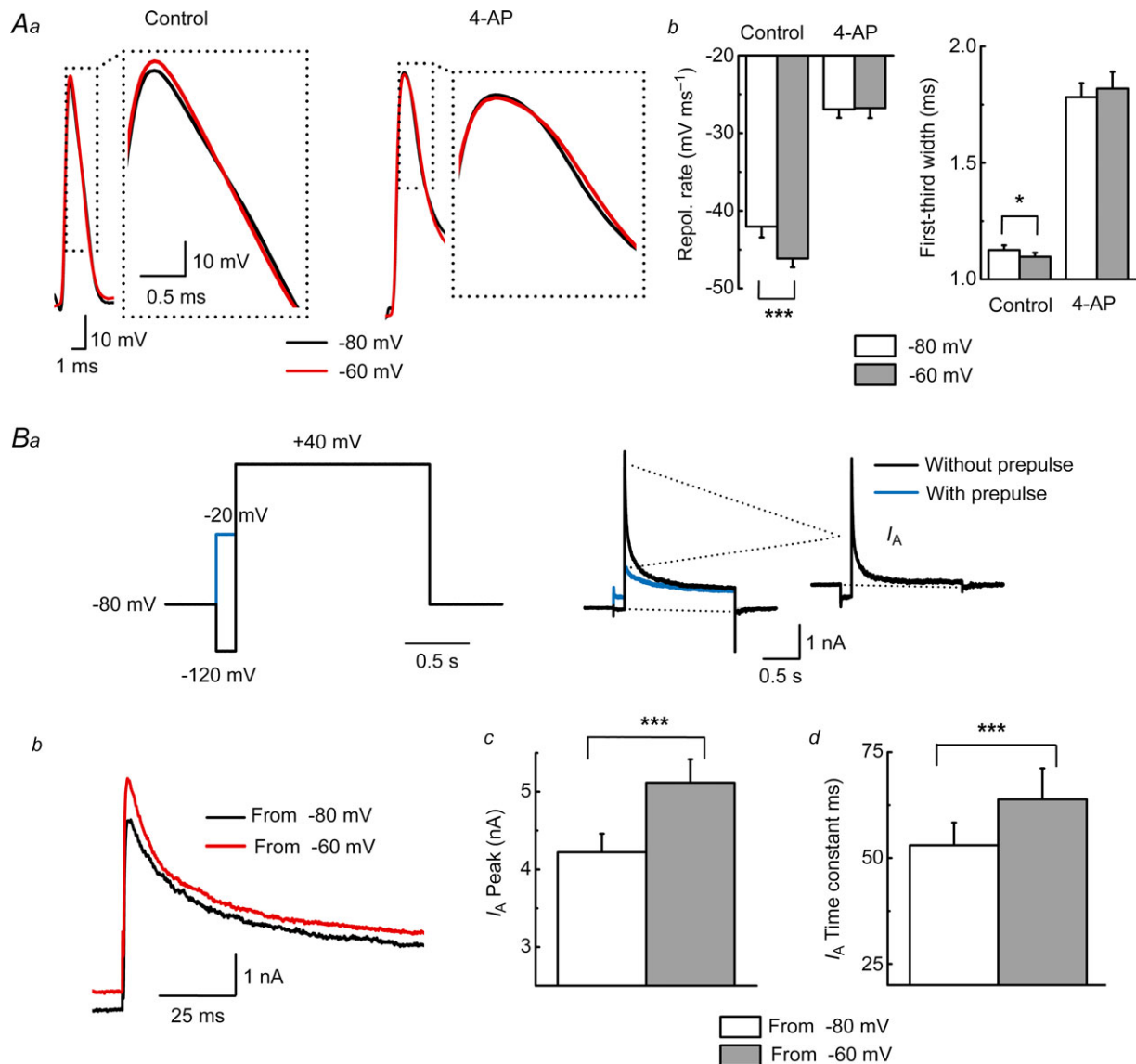
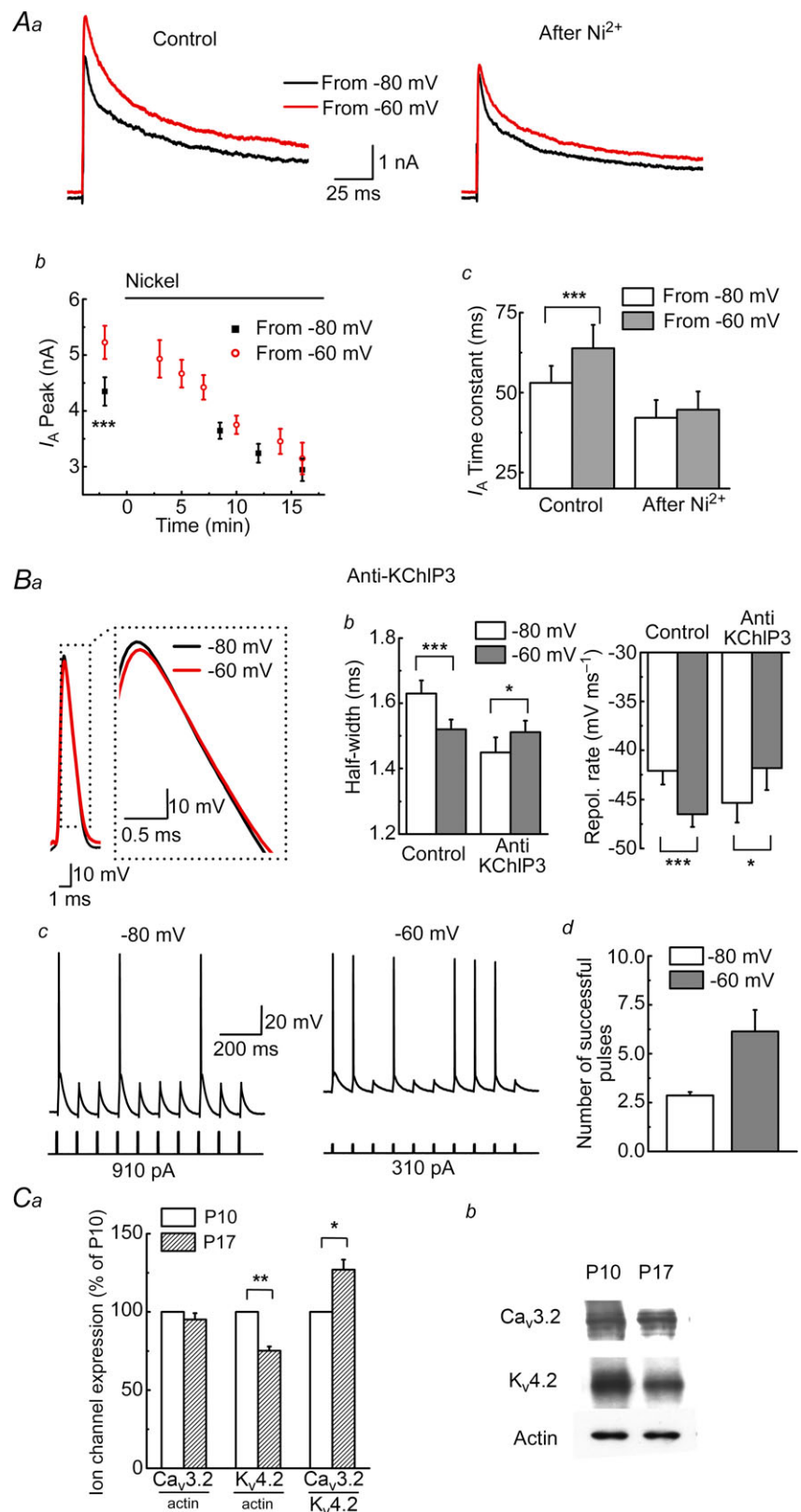


Figure 8. A-type potassium current (I_A) is implicated in the short-term intrinsic plasticity

Aa, representative traces of spikes elicited by brief threshold depolarizing current pulses at -60 mV or at -80 mV, before (left) and after the addition of 3 mM 4-AP (right). *Ab*, summary bar graphs comparing the action potential parameters obtained when the membrane potential was held at -60 mV with those observed at -80 mV, before (control) and after the addition of 3 mM 4-AP. Note how 4-AP blocks plasticity. *Ba*, prepulse voltage protocol used to isolate the A-type potassium current at two pre-holding potentials: -60 and -80 mV. *Ba*, left, diagram showing the protocol at pre-holding potential of -80 mV. *Ba*, right, the I_A was obtained by subtracting the current elicited with a prepulse to -20 mV, which removes the initial transient current, from those elicited from -120 mV, which contain all of the potassium currents. Dotted lines indicate zero current. *Bb*, representative isolated I_A recorded at two pre-holding potentials: -60 mV and -80 mV. Note how the peak current amplitude was higher when pre-holding potential was held at -60 mV than at -80 mV. The traces are overlaid to facilitate comparison in this figure and the following. *Bc*, summary bar graphs showing how the mean peak current amplitude was statistically higher when membrane potential was held at -60 mV than at -80 mV ($n = 11$ cells). *Bd*, summary bar graphs showing how the mean current time-constant was statistically greater when membrane potential was held at -60 mV than at -80 mV ($n = 11$ cells). $*P < 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$ (-80 mV vs. -60 mV). 4-AP, 4-aminopyridine.

Figure 9. Expression mechanisms underlying the short-term intrinsic plasticity

Aa, representative isolated I_A recorded at two pre-holding potentials: -60 mV and -80 mV obtained before (left) and after the addition of 0.5 mM nickel (right). Note how the differences in the peak current amplitude disappear in the presence of nickel. **Ab**, summary temporal graph showing that the peak current amplitude decreases more at pre-holding potential -60 mV than at -80 mV, during the extracellular application of nickel (0.5 mM). **Ac**, summary bar graph showing how the differences in the current time-constant disappear in the presence of nickel ($n = 11$ cells). **Ba**, representative traces of single spikes elicited by short depolarizing current pulses at -60 mV and at -80 mV in the presence of intracellular anti-KChIP₃ antibody. **Bb**, summary bar graphs comparing the action potential parameters obtained when the membrane potential was held at -60 mV with those observed at -80 mV, in control conditions ($n = 24$) and in the presence of intracellular anti-KChIP₃ antibody ($n = 12$ cells). Note how the internal perfusion of the anti-KChIP₃ antibody blocked the plasticity. **Bc**, example of current clamp traces of the spike generation in response to 10 brief depolarizing current pulses, when membrane potential was held at -60 mV (right) or at -80 mV (left) in the presence of intracellular anti-KChIP₃ antibody. **Bd**, summary bar graph comparing the number of successful pulses obtained when the membrane potential was held at -60 mV with those observed at -80 mV in the presence of intracellular anti-KChIP₃ antibody ($n = 4$ cells). Note that in the presence of intracellular anti-KChIP₃ antibody the change on action potential half-width and repolarization rate was opposite to that in control conditions. **Ca**, graph summarizing the expression of $\text{Ca}_v3.2$ and $\text{K}_v4.2$ channels in hippocampal membrane extracts at P10 and P17 ages. The data were normalized as a percentage of P10 expression. Hippocampal $\text{Ca}_v3.2$ levels were similar in ages P10–P17. However, $\text{K}_v4.2$ levels significantly decreased at 17 days of age in four of four experiments leading to an increase in the $\text{Ca}_v3.2/\text{K}_v4.2$ ratio. **Cb**, individual Western blots of hippocampal membrane extracts. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.



after the eye-opening period, coincident with the plasticity expression, mostly due to the decrease of $K_v4.2$ levels both in hippocampus (Fig. 9C) and in CA1 (Sánchez-Alonso *et al.* 2012). In the same way, the lack of plasticity in CA3 pyramidal neurons and interneurons (Fig. 2) could be linked to fewer $K_v4.2$ channels modulated by $Ca_v3.2$ channels but also to the expression of a different KChIP isoform, which is unable of sensing T-type Ca^{2+} influx to regulate $K_v4.2$ channels, as KChIP₂ in cerebellar stellate cells (Anderson *et al.* 2010).

Another important point of interest is the age dependency of this plasticity. Rat hippocampus is known to mature late in development and extend its maturation to postnatal periods. The synaptic connectivity (Hsia *et al.* 1998; Groc *et al.* 2002, 2003) and morphological characteristics (Liao *et al.* 1999) of CA1 pyramidal neurons acquire mature features around the second week of age at a time that coincides with the eye-opening period. Around this developmental stage, the animal becomes more active and engages in exploratory behaviours that are known to be dependent on hippocampus activity (Langston *et al.* 2010). Such an increase in the activity of the circuit also creates a demand for the development of mechanisms involved in the control of excitability. Here we suggest a possible adaptive mechanism by which neurons could pace their activity by pre-emptively decreasing their excitability in response to sustained subthreshold depolarization. Because of its adaptive properties, deregulation of this type of mechanism could potentially lead to uncontrolled firing and ultimately neurological disorders such as epilepsy.

In summary, we have identified a new Ca^{2+} -dependent homeostatic short-term form of intrinsic plasticity in CA1 pyramidal cells that modifies cell intrinsic excitability based on its resting potential history. The temporal profile of only minutes differs substantially from other forms of homeostatic plasticity that require hours or days of intervention (Grubb & Burrone, 2010; O'Leary *et al.* 2010). We have dissected several important features of this adaptive response: its temporal characteristics, its reversibility and the ion channels and signalling pathways involved. Taking into account that this short-term plasticity is induced by depolarization at subthreshold voltage range, we suggest that this novel intrinsic plasticity provides a natural process through which the cell can modulate the reliability of AP generation evoked by synaptic activation according to its recent membrane potential. The changes elicited by this plasticity might have substantial neurophysiological consequences for synaptic plasticity, synaptic coding and/or transmitter release. The importance of understanding this kind of plasticity reaches beyond fundamental cellular physiology, as deficits in the underlying mechanisms responsible for this kind of homeostasis may contribute to pathological conditions associated with hyperexcitability such as epilepsy.

References

- Aizenman CD & Linden DJ (2000). Rapid, synaptically driven increases in the intrinsic excitability of cerebellar deep nuclear neurons. *Nat Neurosci* **3**, 109–111.
- Anderson D, Mehaffey WH, Iftinca M, Rehak R, Engbers JD, Hameed S, Zamponi GW & Turner RW (2010). Regulation of neuronal activity by Cav3-Kv4 channel signaling complexes. *Nat Neurosci* **13**, 333–337.
- Anderson D, Engbers JD, Heath NC, Bartoletti TM, Mehaffey WH, Zamponi GW & Turner RW (2013). The Cav3-Kv4 complex acts as a calcium sensor to maintain inhibitory charge transfer during extracellular calcium fluctuations. *J Neurosci* **33**, 7811–7824.
- Axmacher N & Miles R (2004). Intrinsic cellular currents and the temporal precision of EPSP-action potential coupling in CA1 pyramidal cells. *J Physiol* **555**, 713–725.
- Blanton MG, Lo Turco JJ & Kriegstein AR (1989). Whole cell recording from neurons in slices of reptilian and mammalian cerebral cortex. *J Neurosci Methods* **30**, 203–210.
- Campanac E, Gassel C, Baude A, Rama S, Ankri N & Debanne D (2013). Enhanced intrinsic excitability in basket cells maintains excitatory-inhibitory balance in hippocampal circuits. *Neuron* **77**, 712–722.
- Carter BC & Bean BP (2009). Sodium entry during action potentials of mammalian neurons: incomplete inactivation and reduced metabolic efficiency in fast-spiking neurons. *Neuron* **64**, 898–909.
- Coleman PA & Miller RF (1989). Measurement of passive membrane parameters with whole-cell recording from neurons in the intact amphibian retina. *J Neurophysiol* **61**, 218–230.
- Connor JA & Stevens CF (1971). Prediction of repetitive firing behaviour from voltage clamp data on an isolated neurone soma. *J Physiol* **213**, 31–53.
- Cudmore RH, Fronzaroli-Molinieres L, Giraud Cudmore RH, Fronzaroli-Molinieres L, Giraud P, Debanne DP & Debanne D (2010). Spike-time precision and network synchrony are controlled by the homeostatic regulation of the D-type potassium current. *J Neurosci* **30**, 12885–12895.
- Fakler B & Adelman JP (2008). Control of K_{Ca} channels by calcium nano/microdomains. *Neuron* **59**, 873–881.
- Fan Y, Fricker D, Brager DH, Chen X, Lu HC, Chitwood RA & Johnston D (2005). Activity-dependent decrease of excitability in rat hippocampal neurons through increases in I_h . *Nat Neurosci* **8**, 1542–1551.
- Fricker D, Verheugen JA & Miles R (1999). Cell-attached measurements of the firing threshold of rat hippocampal neurones. *J Physiol* **517**, 791–804.
- Groc L, Gustafsson B & Hanse E (2002). Spontaneous unitary synaptic activity in CA1 pyramidal neurons during early postnatal development: constant contribution of AMPA and NMDA receptors. *J Neurosci* **22**, 5552–5562.
- Groc L, Gustafsson B & Hanse E (2003). Early establishment of multiple release site connectivity between interneurons and pyramidal neurons in the developing hippocampus. *Eur J Neurosci* **17**, 1873–1880.
- Grubb MS & Burrone J (2010). Activity-dependent relocation of the axon initial segment fine-tunes neuronal excitability. *Nature* **465**, 1070–1074.

- Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stümer W & Wang X (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* **57**, 473–508.
- Harnett MT, Xu NL, Magee JC, Williams SR, Xu NL, Magee JC & Williams SR (2013). Potassium channels control the interaction between active dendritic integration compartments in layer 5 cortical pyramidal neurons: potassium channels control the interaction between active dendritic integration compartments in layer 5 cortical pyramidal neurons. *Neuron* **79**, 516–529.
- Hodgkin AL & Huxley AF (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* **117**, 500–544.
- Hsia AY, Malenka RC & Nicoll RA (1998). Development of excitatory circuitry in the hippocampus. *J Neurophysiol* **79**, 2013–202.
- Jacob V, Petreanu L, Wright N, Svoboda K, & Fox K (2012). Regular spiking and intrinsic bursting pyramidal cells show orthogonal forms of experience-dependent plasticity in layer V of barrel cortex. *Neuron* **73**, 391–404.
- Jerng HH, Pfaffinger PJ & Covarrubias M (2004). Molecular physiology and modulation of somatodendritic A-type potassium channels. *Mol Cell Neurosci* **27**, 343–69.
- Johnston D, Hoffman DA, Magee JC, Poolos NP, Watanabe S, Colbert CM & Migliore M (2000). Dendritic potassium channels in hippocampal pyramidal neurons. *J Physiol* **525**, 75–81.
- Langston RF, Ainge JA, Couey JJ, Canto CB, Bjerknes TL, Witter MP, Moser EI & Moser MB (2010). Development of the spatial representation system in the rat. *Science* **328**, 1576–1580.
- Liao D, Zhang X, O'Brien R, Ehlers MD & Hugarir RL (1999). Regulation of morphological postsynaptic silent synapses in developing hippocampal neurons. *Nat Neurosci* **2**, 37–43.
- Lynch G, Larson J, Kelso S, Barrionuevo G & Schottler F (1983). Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. *Nature* **305**, 719–721.
- Kay AR & Wong RKS (1986). Isolation of neurons suitable for patch-clamping from adult mammalian central nervous systems. *J Neurosci Methods* **16**, 227–238.
- Kim J, Wei DS & Hoffman DA (2005). Kv4 potassium channel subunits control action potential repolarization and frequency-dependent broadening in rat hippocampal CA1 pyramidal neurones. *J Physiol* **569**, 41–57.
- Klee R, Ficker E & Heinemann U (1995). Comparison of voltage-dependent potassium currents in rat pyramidal neurons acutely isolated from hippocampal regions CA1 and CA3. *J Neurophysiol* **74**, 1982–1955.
- Lisman JE (1997). Bursts as a unit of neural information: making unreliable synapses reliable. *Trends Neurosci* **20**, 38–43.
- Mahon S, Casassus G, Mulle C & Charpier S (2003). Spike-dependent intrinsic plasticity increases firing probability in rat striatal neurons in vivo. *J Physiol* **550**, 947–959.
- Malenka RC & Bear MF (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* **44**, 5–21.
- Malenka RC, Kauer JA, Zucker RS & Nicoll RA (1988). Postsynaptic calcium is sufficient for potentiation of hippocampal synaptic transmission. *Science* **242**, 81–84.
- Mitterdorfer J & Bean BP (2002). Potassium currents during the action potential of hippocampal CA3 neurons. *J Neurosci* **22**, 10106–10115.
- Muñoz-Cuevas J, Vara H & Colino A (2004). Characterization of release-independent short-term depression in the juvenile rat hippocampus. *J Physiol* **558**, 527–548.
- Numann RE, Wadman WJ & Wong RK (1987). Outward currents of single hippocampal cells obtained from the adult guinea-pig. *J Physiol* **393**, 331–353.
- O'Leary T, van Rossum MCW & Wyllie DJAT (2010). Homeostasis of intrinsic excitability in hippocampal neurones: dynamics and mechanism of the response to chronic depolarization. *J Physiol* **588**, 157–170.
- Pongs O & Schwarz JR (2010). Ancillary subunits associated with voltage-dependent K⁺ channels. *Physiol Rev* **90**, 755–796.
- Raastad M & Shepherd GM (2003). Single-axon action potentials in the rat hippocampal cortex. *J Physiol* **548**, 745–752.
- Sánchez-Alonso JL, Muñoz-Cuevas J, Vicente-Torres MA & Colino A (2010). Role of low-voltage-activated calcium current on the firing pattern alterations induced by hypothyroidism in the rat hippocampus. *Neuroscience* **171**, 993–1005.
- Sánchez-Alonso JL, Sánchez-Aguilera A, Vicente-Torres MA & Colino A (2012). Intrinsic excitability is altered by hypothyroidism in the developing hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience* **207**, 37–51.
- Soleng AF, Chiu K & Raastad M (2003). Unmyelinated axons in the rat hippocampus hyperpolarize and activate an H current when spike frequency exceeds 1 Hz. *J Physiol* **552**, 459–470.
- Spigelman I, Zhang L & Carlen PL (1992). Patch-clamp study of postnatal development of CA1 neurons in rat hippocampal slices: membrane excitability and K⁺ currents. *J Neurophysiol* **68**, 55–69.
- Storm JF (1987). Action potential repolarization and a fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* **385**, 733–59.
- Takahashi K, Ueno S & Akaike N (1991). Kinetic properties of T-type Ca²⁺ currents in isolated rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* **65**, 148–155.
- Thompson SM & Wong RK (1991). Development of calcium current subtypes in isolated rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* **439**, 671–689.
- Tong H, Steinert JR, Robinson SW, Chernova T, Read DJ, Oliver DL & Forsythe ID (2010). Regulation of Kv channel expression and neuronal excitability in rat medial nucleus of the trapezoid body maintained in organotypic culture. *J Physiol* **588**, 1451–1468.
- Williams SR & Stuart GJ (1999). Mechanisms and consequences of action potential burst firing in rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol* **521**, 467–482.

- Williams SR & Stuart GJ (2003). Voltage- and site-dependent control of the somatic impact of dendritic IPSPs. *J Neurosci* **23**, 7358–7367.
- Xu W, Morishita W, Buckmaster PS, Pang, ZP, Malenka RC, & Südhof TC (2012). Distinct neuronal coding schemes in memory revealed by selective erasure of fast synchronous synaptic transmission. *Neuron* **73**, 990–1001.
- Zang W & Linden DJ (2003). The other side of the engram: experience-driven changes in neuronal intrinsic excitability. *Nat Rev Neurosci* **4**, 885–900.

Additional information

Competing interests and funding

The authors declare that they have no competing interests.

Author contributions

S-A.A., S-A.J.L., V-T.M.A. and C.A. conceived and designed the experiments, performed the data collection and performed the data analysis and interpretation. C.A. drafted the manuscript. All authors contributed to the revision of the manuscript and approved the final version of the manuscript.

Funding

This research was supported by the Dirección General de Investigación Científica y Técnica. Grant numbers: SAF2010-20073 and BFU2012-37156-C03-01.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the assistance of Nuria Pérez with the biochemical experiments and Dr Javier Munoz-Cuevas and Liset Menéndez de la Prida with the critical revision of the manuscript.